

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

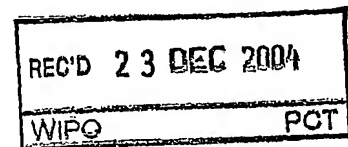
05.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年11月7日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-379076  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2003-379076]



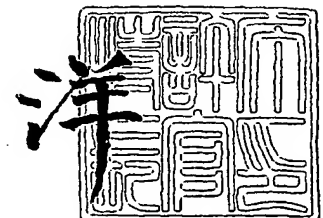
出願人 株式会社豊田中央研究所  
Applicant(s): トヨタ自動車株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 PNTCA001  
【提出日】 平成15年11月 7日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株式会社豊田中央研究所内  
    【氏名】 石田 亘広  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株式会社豊田中央研究所内  
    【氏名】 徳弘 健郎  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株式会社豊田中央研究所内  
    【氏名】 長森 英二  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株式会社豊田中央研究所内  
    【氏名】 高橋 治雄  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町 1 番地 トヨタ自動車株式会社内  
    【氏名】 齋藤 聡志  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町 1 番地 トヨタ自動車株式会社内  
    【氏名】 大西 徹  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000003609  
    【氏名又は名称】 株式会社豊田中央研究所  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000003207  
    【氏名又は名称】 トヨタ自動車株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 110000017  
    【氏名又は名称】 特許業務法人アイテック国際特許事務所  
    【代表者】 伊神 広行  
    【電話番号】 052-218-3226  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 129482  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0104390

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

以下の (a) ~ (c) のいずれかに記載の塩基配列を有し、有機酸存在下での発現用プロモーターである DNA。

(a) 配列番号: 1 ~ 6 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA。

(b) 配列番号 1 ~ 6 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

(c) 配列番号: 1 ~ 6 のいずれかに記載の塩基配列において 1 あるいは 2 以上の塩基が置換、欠失、付加、及び/又は挿入された配列からなる DNA。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の DNA の一部分であって、有機酸存在下での発現用プロモーターである DNA。

**【請求項 3】**

サッカロマイセス属酵母の高浸透圧応答 7 遺伝子 (HOR 7 遺伝子)、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 2 遺伝子 (TDH 2 遺伝子)、熱ショックタンパク質 30 遺伝子 (HSP 30 遺伝子)、ヘキソース輸送タンパク質 7 遺伝子 (HXT 7 遺伝子)、チオレドキシンペルオキシダーゼ 1 遺伝子 (AHP 1 遺伝子)、及び膜タンパク質 1 関連遺伝子 (MRH 1 遺伝子) のいずれかの遺伝子のプロモーター活性を有し、有機酸存在下での発現用プロモーターである DNA。

**【請求項 4】**

有機酸生産のための DNA の発現用である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の DNA。

**【請求項 5】**

前記有機酸は乳酸である、請求項 4 に記載の DNA。

**【請求項 6】**

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の DNA を含む遺伝子組換え用 DNA 構築物。

**【請求項 7】**

前記 DNA に機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードする DNA を備える、請求項 6 に記載の DNA 構築物。

**【請求項 8】**

前記有機酸生産に関与するタンパク質は乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、請求項 7 に記載の DNA 構築物。

**【請求項 9】**

前記タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素である、請求項 8 に記載の DNA 構築物。

**【請求項 10】**

さらに、オートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子に対する相同組換え用の DNA を備える、請求項 6 ~ 9 のいずれかに記載の DNA 構築物。

**【請求項 11】**

前記酵母遺伝子は、ピルビン酸脱炭酸酵素 1 (PDC 1) 遺伝子である、請求項 10 に記載の DNA 構築物。

**【請求項 12】**

プラスミドベクター又はウイルスベクターである、請求項 6 ~ 11 のいずれかに記載の DNA 構築物。

**【請求項 13】**

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の DNA を保持する形質転換体。

**【請求項 14】**

前記 DNA に機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードする DNA を備える、請求項 13 に記載の形質転換体。

**【請求項 15】**

前記有機酸生産に関与するタンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である。

る、請求項 14 に記載の形質転換体。

【請求項 16】

請求項 1～3 のいずれかに記載の DNA と前記有機酸生産に関与するタンパク質をコードする DNA とは、宿主染色体上に組み込まれている、請求項 14 又は 15 に記載の形質転換体。

【請求項 17】

酵母である、請求項 13～16 のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項 18】

請求項 1～3 のいずれかに記載の DNA 及び該 DNA に対して機能的に結合された乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA を酵母染色体上に保持し、これらの DNA の少なくとも一部によってオートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子が破壊されている、形質転換酵母。

【請求項 19】

前記オートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子は、ピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子である、請求項 18 に記載の形質転換酵母。

【請求項 20】

前記乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素である、請求項 19 に記載の形質転換酵母。

【請求項 21】

前記酵母はサッカロマイセス属に属するものである、請求項 18～20 のいずれかに記載の形質転換酵母。

【請求項 22】

請求項 1～3 のいずれかに記載の DNA と該 DNA の下流に機能的に結合された所定のタンパク質をコードする DNA とを保持する宿主細胞を使用する、目的遺伝子の発現方法。

【請求項 23】

前記宿主細胞の培養系に有機酸を添加する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記宿主は酵母であり、請求項 1～3 のいずれかに記載の DNA と前記タンパク質をコードする DNA とを酵母染色体上に保持し、これらの DNA の少なくとも一部によってオートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子が破壊されている、請求項 22 又は 23 に記載の発現方法。

【請求項 25】

前記タンパク質は、有機酸生産に関与するタンパク質である、請求項 24 に記載の発現方法。

【請求項 26】

前記タンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

請求項 1～3 のいずれかに記載の DNA と該 DNA の下流に機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードする DNA とを保持する形質転換酵母を使用する、有機酸の生産方法。

【請求項 28】

前記有機酸は乳酸であり、前記タンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 DNA を酵母染色体上に保持し、これらの DNA の少なくとも一部によってピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子が破壊されている、請求項 27 又は 28 に記載の生産方法。

【請求項 30】

以下の (a)～(c) のいずれかに記載のプロモーター活性を有する DNA。

- (a) 配列番号: 1～6 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA。
- (b) 配列番号 1～6 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。
- (c) 配列番号: 1～6 のいずれかに記載の塩基配列において 1 あるいは 2 以上の塩基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された配列からなる DNA。

【請求項 31】

請求項 29 に記載の DNA の一部分であって、プロモーター活性を有する DNA。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】有機酸存在下におけるプロモーター及びその利用

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、有機酸存在下におけるプロモーターDNA、DNA構築物、形質転換体、組換え遺伝子の発現方法、及びこれを利用した有機酸の生産方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

組換えDNA技術の進歩により、微生物、カビ、動植物および昆虫などの宿主で外来遺伝子を発現させ、その形質転換体を増殖させることによって、目的遺伝子産物を取得する技術が発展してきた。例えば、遺伝子組換え酵母などの培養によれば、発酵生産により大量の目的遺伝子産物を生産させることも可能である。L-乳酸などの有用な有機酸の生産については、L-乳酸脱水素酵素遺伝子を酵母サッカロマイセス・セレビシエ属に導入し、L-乳酸を生産させる試みが多数報告されている。

## 【0003】

組換え体において目的産物の高生産性を確立するには、安定した遺伝子高発現系を構築することが必要である。本発明者らは、既に、染色体中のPDC1遺伝子プロモーターの下流に目的とする有用遺伝子（この場合は、L-乳酸脱水素酵素遺伝子）を結合させると同時に、酵母染色体中のPDC1遺伝子を破壊することによって、本来のPDC1遺伝子プロモーター機能を利用してL-乳酸脱水素酵素遺伝子を発現させつつ、本来の当該プロモーターによって発現されるPDC1タンパク質の発現を排除するシステムを開発した。このシステムを用いることで、従来困難であった安定した遺伝子高発現系を確立できることを見出している（特許文献1）。

## 【0004】

かかる安定した遺伝子高発現系が確立されたといえども、組換え産物の生産性をより一層高めるには、強力な発現能を備えるプロモーターが求められる。酵母で公表されているプロモーターとしては、アルコール脱水素酵素1遺伝子（ADH1）プロモーター（非特許文献1）、及びトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子（TPI1）プロモーター（非特許文献2）等を挙げることができる。しかしながら、乳酸のような有機酸を大量生産させることを目的に、有機酸生産に特異的でかつ強力な発現能を備えたプロモーターとしては必ずしも適していない。また、有機酸存在下で強力に発現するプロモーターとしても必ずしも適していない。

【特許文献1】特開2003-164295号

【非特許文献1】J Ferment Bioeng 1998, Vol. 86 (3)

p. 284-289

【非特許文献2】FEMS Microbial Lett 1999, Feb. Vol.

1. 171 (2) p. 133-140

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

そこで、本発明では、有機酸存在下において利用可能なプロモーター、該プロモーターを含むDNA構築物、該DNA構築物を含む形質転換体、該形質転換体による組換え遺伝子の発現方法、該形質転換体を用いた有機酸の生産方法を提供することを、一つの目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明者らは、乳酸を生産している酵母又は乳酸を含む培地で生育する酵母より、mRNAを取得し、定量的PCR法によって詳細な遺伝子発現解析を行ってきた。その結果、乳酸を生産している酵母において特異的に高発現している遺伝子を複数個見出し、そのプロモーターを単離した。そして、これらのプロモーター下流にL-乳酸脱水素酵素遺伝子

を結合させた発現カセットを、既に確立した染色体上のPDC1遺伝子座に導入するとともに、酵母染色体上のPDC1遺伝子を破壊したところ、L-乳酸の大量生産を確認した。すなわち、本発明者らは、有機酸生産下において目的遺伝子の転写を活性化するプロモーターを取得し、これらのプロモーターが実際にL-乳酸の生産量を増大させることを確認し、本発明を完成した。

#### 【0007】

このように有機酸存在下において機能的に結合されたDNAの転写を活性化するプロモーターは、有機酸存在下において目的遺伝子の産物を増大させるのに有用であり、特に、有機酸生産下において目的遺伝子の産物の生産を増大させるのに有用である。したがって、本プロモーターは、有機酸生産に関連するタンパク質遺伝子进行操作可能に結合し、有機酸の生産を増大させるのに使用できる。このプロモーターを利用すれば、遺伝子組換えにより、サッカロマイセス属などの酵母を乳酸などの有機酸を生産させるように形質転換した組換え体を得ることができ、このような組換え体は、有機酸の高生産性組換え体として有用である。

#### 【0008】

本発明は、有機酸存在下において利用可能なプロモーターに関し、具体的には以下の形態で提供される。

(1) 以下の(a)～(c)のいずれかに記載の塩基配列を有し、有機酸存在下での発現用プロモーターであるDNA。

(a) 配列番号: 1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA。

(b) 配列番号1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(c) 配列番号: 1～6のいずれかに記載の塩基配列において1あるいは2以上の塩基が置換、欠失、付加、及び/又は挿入された配列からなるDNA。

(2) (1)に記載のDNAの一部であって、有機酸存在下での発現用プロモーターであるDNA。

(3) サッカロマイセス属酵母の高浸透圧応答7遺伝子(HOR7遺伝子)、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素2遺伝子(TDH2遺伝子)、熱ショックタンパク質30遺伝子(HSP30遺伝子)、ヘキソース輸送タンパク質7遺伝子(HXT7遺伝子)、チオレドキシンペルオキシダーゼ1遺伝子(AHP1遺伝子)、及び膜タンパク質1関連遺伝子(MRH1遺伝子)のいずれかの遺伝子のプロモーター活性を有し、有機酸存在下での発現用プロモーターであるDNA。

(4) 有機酸生産のためのDNAの発現用である(1)～(3)のいずれかに記載のDNA。

(5) 前記有機酸は乳酸である、(4)に記載のDNA。

(6) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAを含む遺伝子組換え用DNA構築物。

(7) 前記DNAに機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAを備える、(6)に記載のDNA構築物。

(8) 前記有機酸生産に関与するタンパク質は乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、(7)に記載のDNA構築物。

(9) 前記タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素である、(8)に記載のDNA構築物。

(10) さらに、オートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子に対する相同組換え用のDNAを備える、(7)～(9)のいずれかに記載のDNA構築物。

(11) 前記酵母遺伝子は、ピルビン酸脱炭酸酵素1(PDC1)遺伝子である、(10)に記載のDNA構築物。

(12) プラスミドベクター又はウイルスベクターである、(6)～(11)のいずれかに記載のDNA構築物。

(13) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAを保持する形質転換体。

(14) 前記DNAに機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードす

るDNAを備える、(13)に記載の形質転換体。

(15) 前記有機酸生産に関与するタンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、(14)に記載の形質転換体。

(16) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAと前記乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとは、宿主染色体上に組み込まれている、(14)又は(15)に記載の形質転換体。

(17) 酵母である、(13)～(16)のいずれかに記載の形質転換体。

(18) (1)～(3)のいずれかに記載のDNA及び該DNAに対して機能的に結合された乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを酵母染色体上に保持し、これらのDNAの少なくとも一部によってオートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子が破壊されている、形質転換酵母。

(19) 前記オートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子は、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子である、(18)に記載の形質転換酵母。

(20) 前記乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素である、(19)に記載の形質転換酵母。

(21) 前記酵母はサッカロマイセス属に属するものである、(18)～(20)のいずれかに記載の形質転換酵母。

(22) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAと該DNAの下流に機能的に結合された所定のタンパク質をコードするDNAとを保持する宿主細胞を使用する、目的遺伝子の発現方法。

(22) 前記宿主は酵母であり、(1)～(3)のいずれかに記載のDNAと前記タンパク質をコードするDNAとは、をコードするDNAとを酵母染色体上に保持し、これらのDNAの少なくとも一部によってオートレギュレーション機構を備える酵母遺伝子が破壊されている、(21)に記載の発現方法。

(23) 前記宿主細胞の培養系に有機酸を添加する、(22)に記載の方法。

(24) 前記タンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、(22)又は(23)に記載の方法。

(25) 前記タンパク質は、有機酸生産に関与するタンパク質である、(24)に記載の発現方法。

(26) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAと該DNAの下流に機能的に結合された乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとを保持する酵母を使用する、乳酸の生産方法。

(27) (1)～(3)のいずれかに記載のDNAと該DNAの下流に機能的に結合された有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAとを保持する形質転換酵母を使用する、有機酸の生産方法。

(28) 前記有機酸は乳酸であり、前記タンパク質は、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質である、(27)に記載の方法。

(29) 前記DNAを酵母染色体上に保持し、これらのDNAの少なくとも一部によってピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子が破壊されている、(27)又は(28)に記載の生産方法。

(30) 以下の(a)～(c)のいずれかに記載のプロモーター活性を有するDNA。

(a) 配列番号: 1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA。

(b) 配列番号1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(c) 配列番号: 1～6のいずれかに記載の塩基配列において1あるいは2以上の塩基が置換、欠失、付加、及び/又は挿入された配列からなるDNA。

(31) (30)に記載のDNAの一部であって、プロモーター活性を有するDNA。

。【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

出証特 2004-3113537



本発明のプロモーターは、有機酸存在下において発現を活性化あるいは促進する。すなわち、本発明のプロモーターは、本プロモーターに対して機能的に結合されたタンパク質をコードするDNAの発現を、有機酸の存在下においてはじめて活性化するか、有機酸の存在しないときよりも促進するか、あるいは有機酸の濃度が高まると促進するプロモーター活性を有する（以下、当該活性を本プロモーター活性という。）。ここで、「機能的な結合」とは、結合されたタンパク質をコードするDNAの発現を本プロモーターの影響下あるいは支配下におくような結合をいう。なお、「有機酸」とは、酸性を示す有機化合物であるが、有機酸が備える酸性基としては好ましくはカルボン酸基である。また、有機酸は、遊離の酸の他、有機酸塩を含む。このような有機酸として、具体的には、乳酸、酪酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸、ギ酸、リンゴ酸、クエン酸、マロン酸、プロピオン酸、アスコルビン酸、アジピン酸などを挙げることができ、好ましくは、乳酸である。乳酸にL-乳酸、D-乳酸、及びDL-乳酸があるが、これらのいずれをも含む。「有機酸の存在下」とは、有機酸が本発明のプロモーターDNAを保持する宿主の育成環境において存在することを意味し、該有機酸は本発明のプロモーターを保持する宿主が生産するものであってもよいし、培地など宿主以外から供給されるものであってもよいし、これらの有機酸の培養系における濃度は特に限定されず、本発明のプロモーターに機能的に結合されたコードDNAが発現されあるいは促進される範囲であればよい。

#### 【0010】

本発明の有機酸存在下において転写を活性化するプロモーターDNAは、配列番号：1～6のいずれかに記載される配列からなるプロモーター活性を有するDNAを挙げることができる。本発明のプロモーターDNAは、これらの配列からなるDNAの他、これらの配列のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし、かつ上記プロモーター活性を備えるDNAも含まれる。このようなDNAは、配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAあるいはその一部をプローブとして、一般的なハイブリダイゼーション技術（Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.）により得ることができる。また、かかるDNAは、配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR技術（Saiki, RK. Science, 1985, 230, 1350., et al., Saiki, RK. et al., Science, 1988, 239, 487）により合成することもできる。かかるハイブリダイゼーションあるいはPCRによって配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAと同一性の高いDNAを単離することができる。単離には、好ましくは、ストリンジェントな条件でハイブリダイゼーションを行う。ストリンジェントな条件としては、50%ホルムアミド存在下でハイブリダイゼーション温度が37℃であるハイブリダイゼーション条件あるいはこれと同様のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を意味している。よりストリンジェンシーの高い条件によれば、より同一性の高いDNAを単離できる。かかるハイブリダイゼーション条件としては、例えば、50%ホルムアミド存在下でハイブリダイゼーション温度が約42℃、さらにストリンジェンシーの高い条件としては、50%ホルムアミド存在下で約65℃のハイブリダイゼーション条件を挙げることができる。

#### 【0011】

さらに、本発明のプロモーターDNAとしては、配列番号：1～6のいずれかに記載される塩基配列において、1あるいは2以上の塩基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された塩基配列からなり、本プロモーター活性を有するDNAであってもよい。このようなDNAは、既に述べたハイブリダイゼーション技術やPCR技術等によって得ることもできるし、また、Site-directed mutagenesis法（Kramer, W. & Fritz, HJ., Method Enzymol., 1987, 154, 350）によって、配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列に人工的に変異を導入することによっても得ることができる。

## 【0012】

なお、配列番号: 1~6のいずれかに記載の塩基配列との相同性は、単離されたDNAにおいて70%以上であることが好ましく、より好ましくは80%以上であり、さらに好ましくは90%以上である。なお、DNAの塩基配列のホモロジーは、遺伝子解析プログラムBLASTなどによって決定することができる。なお、DNAの塩基配列のホモロジーは、遺伝子解析プログラムBLAST (<http://blast.genome.ad.jp/> S I T / F A S T A . h t m l ) などによって決定することができる。

## 【0013】

配列番号: 1~6に記載の塩基配列からなる各DNAは、それぞれ、酵母サッカロマイセス セレビジエの高浸透圧応答7遺伝子 (H O R 7 遺伝子)、グリセルアルデヒド3リソ酸脱水素酵素2遺伝子 (T D H 2 遺伝子)、ヘキソース輸送タンパク質7遺伝子 (H X T 7 遺伝子)、熱ショックタンパク質30遺伝子 (H S P 3 0 遺伝子)、チオレドキシン1遺伝子 (A H P 1 遺伝子)、及び膜タンパク質1関連遺伝子 (M R H 1 遺伝子) の遺伝子のプロモーター活性を有するDNA断片として取得されたものである。したがって、本発明のプロモーターDNAは、酵母、あるいはサッカロマイセス属酵母のこれらの遺伝子のプロモーター活性を有するDNAあるいはかかるプロモーター領域に相同性を有し、本プロモーター活性を有するDNAであってもよい。このようなDNAは、配列番号: 1~6のいずれかに記載の塩基配列の少なくとも一部からなるプローブを用いたハイブリダイゼーション技術や、該塩基配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを用いたPCR技術を利用して、酵母から取得することができる。さらに、上述したストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAを選択することができる。

## 【0014】

なお、本発明のプロモーターDNAは、本プロモーター活性を有する限りこのような各種形態のDNAの一部であってもよい。

## 【0015】

なお、配列番号: 1~6に記載の塩基配列からなる各DNAは、乳酸生産酵母において中和条件下 (p H 4 . 0 ~ p H 8 . 0 ) において乳酸発酵下におけるスクリーニングを経て選択されたものである。スクリーニングは、乳酸生産酵母を用いて前記中和条件下において乳酸発酵を行い、発酵開始後一定期間後において採取されたmRNAから得られるcDNAを、定量的PCR技術等により定量することにより高い発現量を示した遺伝子を選抜するものである。このようなスクリーニングにより、乳酸生産酵母において乳酸生産時 (乳酸存在時) において、高発現する遺伝子を抽出することができ、かかる遺伝子のプロモーターを単離することで、乳酸生産時 (乳酸存在時) において高い遺伝子発現を示すプロモーターを得ることができる。

## 【0016】

かかるスクリーニングによって得られるプロモーターは、同時に乳酸によって遺伝子の発現を誘導する乳酸誘導的プロモーターであるということもできる。したがって、かかるプロモーターに乳酸脱水素酵素などの乳酸生産に関与する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを機能的に結合することで、乳酸の生産量の増大によって乳酸の生産が抑制されない、あるいは乳酸の生産量の増大によってさらに乳酸の生産が促進される実用的な乳酸生産酵母などの形質転換体を得ることがおおいに期待される。

## 【0017】

なお、取得したDNAが本プロモーター活性を有するか否かは、当業者において公知のレポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイにより確認することができる。レポーター遺伝子としては、特に制限することなく公知の遺伝子を用いることができ、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (C A T ) 、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (L a c Z ) 、ルシフェラーゼ遺伝子 (L U C ) 、 $\beta$ -グルクロニダーゼ及びグリーンフロッセントプロテイン遺伝子 (G F P ) 等を挙げることができる。この他、遺伝子の発現の確認を該遺伝子によってコードされるタンパク質量や該タンパク質 (酵素) の活

性（例えば、代謝産物の量）を測定可能な遺伝子を用いて、本プロモーター活性の存否を確認することも可能である。さらに他には、遺伝子が発現されることにより得られるmRNAを利用したノーザンハイブリダイゼーション法や定量的PCR法等を用いて遺伝子の転写レベルを測定することによっても本プロモーター活性を確認することができる。なお、本プロモーター活性は、有機酸の存在下において発現を活性化あるいは促進するものであるため、本プロモーター活性の確認にあたっては、有機酸が存在する培養系あるいは有機酸を生産する宿主を用いることが好ましい。

#### 【0018】

本発明のプロモーターDNAは、ゲノムDNAであってもよく、また、化学的に合成されたDNAであってもよい。

#### 【0019】

本発明は、本プロモーターDNAを含む組換え用DNA構築物も提供する。組換え用DNA構築物は、特に限定しないでプラスミド（DNA）、ウイルス（DNA）バクテリオファージ（DNA）、レトロトランスポゾン（DNA）、人工染色体（YAC、PAC、BAC、MAC等）を、外来遺伝子の導入形態（染色体外あるいは染色体内）や宿主細胞の種類に応じて選択してベクターとしての形態をとることができる。したがって、本DNA構築物は、本プロモーターDNAの他、これらのいずれかの態様のベクターとしてのDNA等を備えることができる。本DNA構築物は、好ましくは、プラスミドベクター又ウイルスベクターの形態を採る。また、好ましい原核細胞性ベクター、真核細胞性ベクター、動物細胞性ベクター、植物細胞性ベクターは当該分野において周知である。本DNA構築物は、細胞質あるいは宿主細胞において宿主染色体外において保持されていてもよいし、また、宿主染色体に組み込まれて保持されていてもよい。

#### 【0020】

本DNA構築物は、本プロモーターDNAに対して機能的に結合された所望のタンパク質をコードするDNA（以下、コードDNAともいう。）を備えている。コードDNAは、cDNAのみならず、転写されても翻訳されないDNA配列を含むものであってもよい。タンパク質は特に限定しないが、コードDNAは乳酸等の有機酸生産のためのDNA、すなわち、有機酸生産に関連する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAとすることができる。かかるタンパク質をコードするDNAを本プロモーターDNAに対して機能的に結合させることで、相乗的に有機酸生産が促進されることが期待される。このような酵素としては、乳酸生産の場合には、L-乳酸脱水素酵素、D-乳酸脱水素酵素等の酵素、ピルビン酸生産の場合にはピルビン酸キナーゼ等、酢酸生産の場合にはピルビン酸オキシダーゼ等、コハク酸生産の場合にはスクシニルCoAシンテターゼ等、リンゴ酸の場合にはフマル酸ヒドラターゼ等、クエン酸生産の場合にはクエン酸シンテターゼ等を例示できる。

#### 【0021】

乳酸脱水素酵素（LDH）としては、生物の種類に応じてあるいは生体内においても各種同族体が存在する。本発明において使用する乳酸脱水素酵素としては、天然由来のLDHの他、化学合成的あるいは遺伝子工学的に人工的に合成されたLDHも包含している。LDHとしては、好ましくは、乳酸菌などの原核生物もしくはカビなどの真核微生物由来であり、より好ましくは、植物、動物、昆虫などの高等真核生物由来であり、さらに好ましくは、ウシを始めとする哺乳類を含む高等真核生物由来である。最も好ましくは、ウシ由来のLDH（L-LDH）である。例えば、ウシ由来のLDHとして配列番号：8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を挙げることができる。また、かかるLDHをコードするDNAとしては、配列番号：7に記載される塩基配列からなるDNAを挙げることができる。さらに、本発明におけるLDHは、これらのLDHのホモログも包含している。LDHホモログは、天然由来のLDHのアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸でありかつLDH活性を有しているタンパク質、および、天然由来のLDHとアミノ配列の相同性が少なくとも70%、好ましくは80%以上を有しかつLDH活性を有しているタンパク質を含んでいる。

## 【0022】

本DNA構築物においては、相同組換えにより本プロモーターDNA及びコードDNAを宿主染色体に組み込むための相同組換え用のDNA配列を備えることができる。このようなDNAを備えることにより、宿主染色体の所望の部位にこれらのDNAの組み込みを達成する他、所望の遺伝子の破壊を同時に達成することができる。相同組換え用DNA配列は、宿主染色体において本DNAを導入しようとするターゲット部位あるいはその近傍のDNA配列と相同なDNA配列である。相同組換え用DNA配列は、一つのターゲット遺伝子あるいはその近傍の少なくとも1箇所に相同である1の配列を有しており、好ましくは、ターゲット遺伝子あるいはその近傍の少なくとも2箇所にそれぞれ相同な配列を備えている。例えば、2個の相同組換え用DNA配列を、染色体上のターゲット部位の上流側と下流側のDNAとのそれぞれに相同なDNA配列とし、これらの相同組換え用DNA配列の間に本プロモーターDNAやコードDNAを連結することが好ましい。

## 【0023】

本DNA構築物は、宿主染色体上に相同組換えにより宿主染色体に本DNAを導入する場合であって、適切な相同組換え用DNAを選択することで、宿主染色体上の所望の部位において、本プロモーターDNA及びコードDNAを組み込んで、本プロモーターDNAによりコードDNAの発現を制御することができるようになる。このような染色体上への組み込みを実現するための相同組換え用DNAの選択は、当業者において周知であり、当業者であれば必要に応じて適切な相同組換え用DNAを選択して相同組換え用DNA構築物を構成することができる。

本プロモーターDNAを宿主染色体が本来的に備えている場合には、適切な相同組換え用DNAを選択することで、宿主染色体上において本プロモーターDNAが本来的に存在する部位において、本プロモーターDNA及びコードDNAを組み込むこともできる。こうすることで、染色体上の本プロモーターDNAが本来制御すべき内在性コードDNAに替えて、本プロモーターDNAによって外来性コードDNAを制御させることができる。この結果、本来発現が活性化されるべき内在性コードDNAの発現を抑止する一方、本プロモーターDNAが本来的に存在する染色体上の部位において、本プロモーターDNAによって外来性のコードDNAの発現を活性化させることができる。このようなDNA構築物は、本プロモーターDNAと、本プロモーターによって制御される内在する構造遺伝子の少なくとも一部を相同組換え用DNAとして備えることでこのような宿主染色体上への組み込みが可能となる。

## 【0024】

なお、相同組換え用DNAの選択により、本プロモーターDNAの染色体組み込みと同時に宿主染色体上の所望の遺伝子を破壊することができる。破壊する遺伝子は、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子であることが好ましいが、これについては後述する。例えば、サッカロマイセス属酵母などの酵母において、有機酸生産に関与するタンパク質をコードするDNAを用いて有機酸を生産する場合、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子（特に、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子）を破壊することが好ましい。ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のプロモーターは強力であるからであり、後述するようにオートレギュレーション機構を備えているからである。該遺伝子を破壊する組み込みにより、ピルビン酸脱炭酸酵素の発現を抑制し外来DNAによってコードされたタンパク質を発現させることができる。さらに、本プロモーターによって、外来コードDNAの発現は有機酸存在下において発現が活性化されるため、発現されたタンパク質により有機酸生産が促進されることで一層外来コードDNAの発現が促進される。

## 【0025】

特に、乳酸脱水素酵素をコードするDNAを用いて乳酸を生産する場合には、当該破壊形態が一層有効である。ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子は、乳酸脱水素酵素の基質であるピルビン酸を基質とし乳酸脱水素酵素に対して競合的に作用するからである。該遺伝子を破壊することで、ピルビン酸脱炭酸酵素の発現を抑制し乳酸脱水素酵素を発現させることができ、同時に乳酸脱水素酵素は本プロモーターDNAにより有機酸（乳酸）存在下にお

いて発現が活性化されるため、乳酸生産がより一層促進されるものと期待される。このような染色体上への組み込みを達成するにあたっては、本DNA構築物は、例えば、ピルビン酸脱炭酸酵素の構造遺伝子の一部あるいはその近傍の配列（開始コドンの近傍の配列、開始コドンの上流域の配列（この構造遺伝子のプロモーターを含む）、構造遺伝子内の配列等）、あるいはさらに染色体上の該遺伝子の上流域及び／又は下流側と相同なDNA配列を含むことができる。好ましくは、サッカロマイセス属（特にセレビシエ）を宿主として、この宿主のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子をターゲットとするDNA構築物とする。

#### 【0026】

ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のプロモーターは強力なプロモーターであることから、本プロモーターDNAと組み合わせて使用することができる。すなわち、酵母染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子（好ましくはピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子）の内在部位において、当該遺伝子プロモーターによって本来制御されるべき構造遺伝子に替えて乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを導入する相同組換え用DNA構築物と、酵母染色体上の本DNAプロモーターに内在部位において本DNAプロモーターによって本来制御されるべき構造遺伝子に替えて乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを導入する相同組換え用DNA構築物とを用いることができる。PDC（好ましくはPDC1）遺伝子プロモーターと本プロモーターDNAとの双方による発現促進効果と、PDC（好ましくはPDC1）構造遺伝子の破壊によるピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子の発現抑制とによって、一層効果的な乳酸製造が期待される。また、PDC1遺伝子が破壊されていても、代替的に他のPDC5遺伝子等によりピルビン酸脱炭酸酵素は生合成されるため、酵母の増殖性能は担保されている。なお、このようなDNA構築物には、PDC1プロモーター活性を有するDNAを、プロモーターDNA及び相同組換え用DNAの双方の機能を発揮するものとして保持することができる。PDC1プロモーターDNAとしては、配列番号：9に記載の塩基配列からなるDNAの他、該DNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズするDNA、該塩基配列において1あるいは2以上の塩基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された配列からなるDNAを用いることができる。このようなDNAは、本プロモーターDNAと同様にして単離することができる。

#### 【0027】

なお、PDC1遺伝子は、本発明者らが既に開示しているように、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子である（特開2003-164295号）。オートレギュレーション機構とは、同じ機能を有する遺伝子が同一生物において複数存在し、通常、そのうちの少なくとも一つは発現しているが、残りは抑制されており、通常発現している遺伝子が破壊などにより機能しなくなった場合にのみ、残りの遺伝子が発現されてその機能を継続する機構を意味している。かかる機構が存在するため、例えば、酵母のPDC1遺伝子が破壊されたとしても、PDC5遺伝子が活性化され、酵母のエタノール生産機能は維持され、生理的機能が維持されることになる。このようなオートレギュレーション機構が存在する遺伝子を破壊することで、生物自体の生存、増殖機能を維持することができて、結果として、外来DNAを保持する形質転換体の増殖を維持しながら目的産物を効果的に生産させることができる。

#### 【0028】

なお、DNA構築物には、ターミネーター他、必要に応じてエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）を連結することができる。選択マーカーとしては、特に限定しないで、薬剤抵抗性遺伝子、栄養要求性遺伝子などを始めとする公知の各種選択マーカー遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性G418遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、シクロヘキサミド耐性遺伝子等を使用することができる。

#### 【0029】

本DNA構築物は、適当な宿主細胞に、トランスフォーメーション法や、トランスフェ

クシオン法、接合法、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション法、リポフェクシオン法、酢酸リチウム法、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿法、アグロバクテリア法、PEG法、直接マイクロインジェクション法等の各種の適切な手段のいずれかにより、これを導入することができる。本DNA構築物の導入後、その受容細胞は、選択培地で培養される。

#### 【0030】

宿主細胞は、*Eshrichia coli*、*Bacillus subtilis*などの細菌、サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*) などのサッカロマイセス属酵母、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの酵母、sf9、sf21等昆虫細胞、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) などの動物細胞、サツマイモ、タバコなどの植物細胞などとして行うことができる。好ましくは、酵母などのアルコール発酵を行う微生物あるいは耐酸性微生物であり、例えば、サッカロマイセス・セレビシエなどのサッカロマイセス属を始めとする酵母である。具体的には、サッカロマイセス・セレビシエIFO2260株や同YPH株を例示できる。

#### 【0031】

なお、本DNA構築物が宿主に導入されたか否か、あるいは染色体上の所望の部位に本DNA構築物が導入されたか否かの確認は、PCR法やサザンハイブリダイゼーション法により行うことができる。例えば、形質転換体からDNAを調製し、導入部位特異的プライマーによりPCRを行い、PCR産物について、電気泳動において予期されるバンドを検出することによって確認できる。あるいは蛍光色素などで標識したプライマーでPCRを行うことでも確認できる。これらの方法は、当業者において周知である。

#### 【0032】

本DNA構築物によって形質転換された形質転換体においては、DNA構築物の構成成分である本プロモーターDNAやコードDNA等が染色体上あるいは染色体外因子 (人工染色体を含む) 上に存在することになる。上述のDNA構築物であって、相同組換えを達成できる相同組換え用DNA構築物が導入されると、宿主染色体上の所望の位置に本プロモーターDNAと該DNAに対して機能的に結合されたコードDNAを保持する形質転換体が得られる。

#### 【0033】

宿主染色体に対する相同組換えにより得られる形質転換体の好ましい一形態は、本プロモーターDNAが本来内在する染色体上の部位において、本プロモーターDNAに対して機能的に結合されたコードDNAを備える形態である。かかる形質転換体によれば、有機酸存在下において本プロモーターDNAによりコードDNAの発現が活性化されるため、有機酸存在下にて目的産物を効果的に得ることができる。この形態においては、好ましくは、コードDNAは、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードしている。かかる形質転換体は、当該乳酸脱水素酵素活性により乳酸を製造し、さらに該乳酸製造によりさらなる該酵素活性の発現が促進され、乳酸製造が促進される。

#### 【0034】

また、本発明の形質転換体の好ましい他の一形態は、宿主 (酵母等) 染色体上のオートレギュレーション機構を備える遺伝子が破壊されているとともに、該遺伝子のプロモーターに替えて本プロモーターDNAと該DNAに機能的に結合されたコードDNAを備える形態である。かかる形質転換体によれば、特に、これらのDNAによって、宿主に致命的な機能障害を与えることなく、コードDNAを発現させることができる。コードDNAとして乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを用いる場合、宿主の増殖性等に障害を及ぼすことを抑制して乳酸を製造することができる。

#### 【0035】

また、本発明の形質転換体の好ましい他の一形態は、宿主 (酵母等) 染色体上のPDC1遺伝子が破壊されているとともに、該遺伝子のプロモーターに替えて本プロモーターDNAと該DNAに機能的に結合されたコードDNAを備える形態である。かかる形質転換体によれば、特に、コードDNAとして乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコード



するDNAを用いる場合、競合するピルビン酸脱炭酸酵素の発現を抑制して、本プロモーターDNAにより乳酸脱水素酵素を発現させることができ、乳酸製造に適した形質転換体を得ることができる。既に述べたようにPDC1遺伝子を破壊しても、該遺伝子には、オートレギュレーション機構が存在するため、宿主の増殖性等が保持されている。

#### 【0036】

さらに他の好ましい形質転換体の一形態としては、宿主染色体上に本プロモーターDNAと該DNAに機能的に結合したコードDNAを備えるとともに（例えば、上記した好ましい三形態のいずれかあるいはこれらの組み合わせで）、宿主染色体上あるいは宿主染色体外において、PDC1プロモーターDNAと該DNAに機能的に結合したコードDNAを備える形態である。かかる形態によれば、コードDNAをいずれも乳酸等の有機酸の生合成に関連する酵素活性を有するタンパク質をコードするものとしたとき、PDC1プロモーターにより構成的に有機酸の生合成酵素の発現が活性化される一方、本プロモーターDNAにより有機酸誘導的に有機酸生合成酵素の発現が活性化されるため、高効率な有機酸生産が期待される。特に、PDC1プロモーターとして宿主染色体上に内在するものを利用する形態であることが好ましい。この場合、PDC1プロモーターによる安定的な発現が可能となる。

#### 【0037】

なお、これらの形質転換体においては、宿主は酵母であることが好ましく、なかでも、サッカロマイセス属酵母であることが好ましく、さらに、サッカロマイセスセレビジエであることが好ましい。さらに、コードDNAは、乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAであることが好ましく、より好ましくは、ウシ由来の乳酸脱水素酵素をコードするDNAである。

#### 【0038】

本発明においては、宿主染色体において本プロモーターDNAによりコードDNAを発現させることが重要である。特に、本来有機酸を生産しないあるいは本来の有機酸生産量より当該生産量を増大させるような形質転換体として取得しようとするとき、2  $\mu$ m DNAを利用したYEPタイプのプラスミドベクターによる方法がよく用いられているが、この場合、かかるコードDNAは保持されにくいことが報告されている。しかしながら、本発明においては、このようなDNA保持率が単に高いことのみによるとは思えない高い発現活性が見出されている。したがって、本発明によれば、有機酸存在下で本プロモーターDNAを染色体上において利用し、該DNAに機能的に結合したコードDNAの発現を活性化することでコードDNAの安定かつ予想を超える高発現性を備える遺伝子発現系を構築することができる。さらに、コードDNAが乳酸脱水素酵素のように有機酸の生合成に関連する酵素活性を有するタンパク質をコードするものとした場合には、本プロモーターDNAによって発現が活性化されたコードDNAの最終産物たる有機酸によってさらに本プロモーターDNAによるコードDNAの発現の活性化が期待できる。すなわち、相乗的かつ連続的なタンパク質の生合成及び最終産物の生合成の促進が期待できる。

#### 【0039】

また、コードDNAとして乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを用いた場合において、本プロモーターDNAとコードDNAを宿主染色体のPDC1遺伝子に導入し破壊することにより、上記した効果に加えて、PDC1遺伝子の破壊によるピルビン酸脱炭酸酵素発現の抑制効果によって、効果的に乳酸製造を促進することができる。

#### 【0040】

本発明のプロモーターDNAの下流に乳酸脱水素酵素をコードするDNAを結合させて染色体中に導入するのにあたり、乳酸生産量の増大を目的として、この遺伝子導入断片を染色体中に複数個導入した形質転換体を作ることができる。この場合、本プロモーターDNAは単一の種類を使用することができる他、本プロモーターを2種類以上組み合わせ使用することもできる。ここで、本プロモーターを2種類以上組み合わせ使用する形態とは、それぞれのプロモーターにコードDNAを結合させてそれぞれのプロモーターによ

り乳酸脱水素酵素を発現させる形態をいう。例えば、本プロモーターDNAのうち2種類以上のプロモーターDNAのそれぞれに乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを結合させて作製した1種あるいは2種類以上の遺伝子導入断片を導入した形質転換体を作ることができる。より具体的に例示すると、HOR7プロモーターの下流にコードDNAを結合させた遺伝子導入断片と、TDH2プロモーターの下流にコードDNAを結合させた遺伝子導入断片とを宿主に導入することで、HOR7プロモーターによる乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質の発現と、TDH2プロモーターによる乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質の発現とが同一形質転換体内で組み合わせられて発現される形質転換体を得ることができる。なお、上記プロモーターに限定されず、例えばPDC1プロモーターなどの他のプロモーターと組み合わせることもできる。

#### 【0041】

本発明を拘束するものではないが、このように宿主染色体上で該染色体上に本来的に内在するプロモーター（本プロモーターDNAやPDC1プロモーター）を用いて乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAの発現を活性化することにより、予測を超えた乳酸生産量の増大が得られたことは、染色体上のこれらのプロモーターの本来内在される部位において、これらのプロモーターにより本来制御されるべき構造遺伝子に替えて乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを発現させたことに主たる起因があると考えられる。すなわち、染色体上のこれらのプロモーター部位において該プロモーターを利用して他の乳酸脱水素酵素を代替的に発現させるか、あるいは該プロモーター及び構造遺伝子に替えて他のプロモーターにより乳酸脱水素酵素を代替的に発現させることが重要であると考えられる。さらに、これらの起因事項に加え、PDC1プロモーターについては、PDC1プロモーターが強力な構成的プロモーターであり、かつオートレギュレーション機構を備える遺伝子のプロモーターであることも乳酸生産量の増大に寄与していると考えられ、また、本プロモーターDNAについては、有機酸（乳酸）の存在下において発現を活性化する誘導的プロモーターであることが寄与していると考えられる。

#### 【0042】

本DNA構築物が導入されて得られる形質転換体を培養することにより、培養物中に外来遺伝子の発現産物であるタンパク質を生成させることができる。このような発現方法によれば、有機酸存在下においてコードDNAの発現が促進されるため、培養系に有機酸を添加するなどにより有機酸を培養系に存在させることで、有用タンパク質の生産を促進することができる。また、コードDNAが有機酸生産に関与するタンパク質をコードするものである場合、該コードDNAの発現が促進されて有機酸が生産されれば、それによって、さらにコードDNAの発現が促進される。なお、コードDNAが有機酸生産に関与するタンパク質をコードするものであっても、培養系に外部から有機酸を添加することができる。該タンパク質が、乳酸脱水素酵素等の有機酸の生合成に関連する酵素である場合、培養系においては乳酸等の有機酸が生産される。培養系から有機酸を分離する工程を実施することにより、有機酸を得ることができる。なお、本発明において培養物とは、培養上清の他、培養細胞あるいは菌体、細胞若しくは菌体の破砕物を包含している。

#### 【0043】

本発明の形質転換体の培養にあたっては、形質転換体の種類に応じて培養条件を選択することができる。このような培養条件は、当業者においては周知である。乳酸などの有機酸の生産にあたっては、必要に応じて産物である乳酸等の中和を行うかあるいは、連続的に乳酸を除去する等の処理を行うこともできる。大腸菌や酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化可能な炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれも使用することができる。炭素源としては、グルコース、フルクトース、スクロース、デンプン、セルロース等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコールを用いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等



の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩またはその他の含窒素化合物の他、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等を用いることができる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウムなどを用いることができる。

#### 【0044】

培養は、通常、振とう培養または通気攪拌培養等の好気条件下、30℃で6～24時間行う。培養期間中、pHは2.0～6.0に保持することが好ましい。また、pHの調整は、無機あるいは有機酸、アルカリ溶液等を用いて行うことができる。培養中は、必要に応じてアンピシリン、テトラサイクリンなどの抗生物質を培地に添加することができる。

#### 【0045】

培養終了後、培養物から遺伝子産物を分離するには、通常、の乳酸精製手段を使用することができる。例えば、形質転換細胞内に生産された場合は、常法により菌体を超音波破壊処理、摩砕処理、加圧破碎などに細胞を破壊して、遺伝子産物を細胞と分離することができる。この場合、必要に応じてプロテアーゼを添加する。また、培養上清に遺伝子産物が生産された場合には、この溶液を、ろ過、遠心分離などにより固形分を除去する。

#### 【0046】

これらの粗抽出画分に対しては、従来公知の各種精製分離法等を利用して、乳酸を精製することができる。また、必要に応じて、当該粗抽出画分及びその精製物に対してエステル化等を行うことにより、各種の乳酸誘導体を得ることができる。

#### 【実施例1】

#### 【0047】

以下に、本発明の具体例を記載するが、本発明を以下の具体例に限定する趣旨ではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲で種々の態様で実施できる。

(定量的PCR法によるプロモーターの発現解析)

乳酸生産能をもつ組換え酵母として、特開2003-259878（特願2002-65879）で作製した組換え酵母を用い、中和条件下（pH4.0～pH8.0）で乳酸発酵を行い、発酵開始6時間後と、30時間後の菌体を採取し、これよりRNAを調整した。RNAの調整にはRneasy Miniキット（キアゲン社製）を用いた。得られたRNAをファーストストランドcDNA合成キット（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）に従って、cDNA合成を行った。なお、使用した前記組換え酵母は、酵母IFO2260株（社団法人発行研究所登録株）のトリプトファン合成欠損株を10ml YPD培地にて30℃で対数増殖期まで培養を行い、集菌およびTEバッファーによる洗浄を行い、ついで、0.5ml TEバッファーと0.5mM酢酸リチウムを加え、30℃で振盪培養を行った後に、後述するpBTrp-PDC1-LDHKCBベクターを制限酵素ApaIおよびSacI（いずれも宝酒造製）で処理して添加し、得られたコロニーをトリプトファン選択培地にて培養して安定性が確認できた選抜株について安定したトリプトファン合成能と所定の染色体位置への前記DNA断片の導入を確認した株として取得することができる。

#### 【0048】

上記試料と、標的遺伝子のプライマー、およびライトサイクラーDNAマスターSYBRグリーンI（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）を混合させた後、定量的PCR解析装置 ライトサイクラー（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）によって発現解析を行った。詳細は付属のプロトコールに従った。また、各遺伝子断片量4 fM、20 fM、100 fMを同様にセットし、これをコントロールとして発現量の測定を行った。

#### 【0049】

合計で28種類の遺伝子発現について解析を行った。その中で最終的に有効な発現を確認できた高発現候補プロモーター6種類について、使用したプライマー配列とライトサイクラーで解析した際のTm値を示す。なお、高発現するコントロールプロモーターとして、PDC1遺伝子プロモーター、TDH3遺伝子プロモーターについても解析した。これらのコントロールプロモーターについても、同様にプライマー配列とTm値を示す。

## 【0050】

=HOR7 遺伝子の発現確認用プライマー=  
 5' - CGT CGC CTT CAC TGG TTT AG -3' (配列番号: 10)  
 5' - CAA AAA GGC CAA AGC ACC AG -3' (配列番号: 11)

=TDH2 遺伝子の発現確認用プライマー=  
 5' - CAA GGT AAG TTG ACC GGT ATG -3' (配列番号: 12)  
 5' - GAT GGA AGA GTT AGA GTC ACC C -3' (配列番号: 13)

=HXT7 遺伝子の発現確認用プライマー=  
 5' - TCA TGG GCT GTT TGG TCT TC -3' (配列番号: 14)  
 5' - AGC GTC GTA GTT GGC ACC TC -3' (配列番号: 15)

=HSP30 遺伝子の発現確認用プライマー=  
 5' - AAT TGC AGT CAG CCG TGA TG -3' (配列番号: 16)  
 5' - TCG ACA GCT TGC TCT GCT TC -3' (配列番号: 17)

=AHP1 遺伝子の発現確認用プライマー=  
 5' - AAC CAA GCG TGG GCT AAG AG -3' (配列番号: 18)  
 5' - GGT TTC CTT GGC AGC GTA AG -3' (配列番号: 19)

=MRH1 遺伝子の発現確認用プライマー=  
 5' - GCT GCC TGT GTT CAC TCC AC -3' (配列番号: 20)  
 5' - TGG CTG CAA AAC GTT ACC AC -3' (配列番号: 21)

=PDC1 遺伝子の発現確認用プライマー=  
 5' - CAA CGA ATT GAA CGC TGC TTA C -3' (配列番号: 22)  
 5' - ATT CAA CGG CTT CCT TAA CTT CTG -3' (配列番号: 23)

=TDH3 遺伝子の発現確認用プライマー=  
 5' - GTT TTC AAG GAA TTA GAC ACT GC -3' (配列番号: 24)  
 5' - CAA CAG TCT TTT GAG TAG CAG TC -3' (配列番号: 25)

## 【0051】

定量的PCRの結果、HOR7 遺伝子プロモーター、TDH2 遺伝子プロモーター、HXT7 遺伝子プロモーター、HSP30 遺伝子プロモーター、AHP1 遺伝子プロモーター

一、MRH1遺伝子プロモーターが選択された。乳酸生産酵母におけるこれらの遺伝子は、PDC1遺伝子やTDH3遺伝子発現と比較して、高い発現を示していた。これらの結果を図1に示す。また、これらの遺伝子は、いずれも非組換え株における発現量よりも高い発現量を示すことができる。以上のことから、これらの遺伝子は、有機酸の存在下において、誘導的に発現されるプロモーターによって発現が活性化されていることがわかった。

#### 【実施例2】

##### 【0052】

(プロモーターの取得と塩基配列決定)

実施例1において有効な発現を示した高発現候補プロモーターとして、6種類の遺伝子のプロモーター(HOR7遺伝子プロモーター、TDH2遺伝子プロモーター、HXT7遺伝子プロモーター、HSP30遺伝子プロモーター、AHP1遺伝子プロモーター、MRH1遺伝子プロモーター)を選び、これらの遺伝子断片をクローニングした。またプロモーター評価のコントロールとして、高発現プロモーターとして知られるPDC1遺伝子プロモーター、TDH3遺伝子プロモーターも取得した。

##### 【0053】

プロモーター取得における当該遺伝子資源としては、酵母IFO2260株(社団法人・発酵研究所に登録されている菌株)のゲノムDNAを鋳型とするPCR増幅法によって単離した。本株をYPD培養液2mlで一晩培養し、これにゲノムDNA調整キット、GenとるくんTM-酵母用-(タカラバイオ社製)を用いて、ゲノムDNAを調整した。また、調整したゲノムDNAは、分光光度計Urtro spec 3000(Amersham Pharmacia Biotech社製)によりDNA濃度を測定した。

##### 【0054】

PCR反応には増幅酵素として、増幅断片の正確性が高いとされるKOD plus DNA polymerase(東洋紡社製)を使用した。調製した酵母IFO2260株のゲノムDNA 50ng、プライマーDNA 50pmol×2、10倍濃縮KOD酵素反応用バッファー 5μl、25mM MgSO<sub>4</sub> 2μl、2mM dNTP mix 5μl、KOD plus DNA polymerase 1.0ユニットを加えた合計で50μlの反応溶液を、PCR増幅装置Gene Amp PCR system 9700(PE Applied Biosystems社製)によってDNA増幅した。PCR増幅装置の反応条件は、96℃ 2分の熱処理を行った後、96℃で30秒、53℃で30秒、72℃で60秒の3つの温度変化を1サイクルとし、これを25サイクル繰り返し、最後に4℃とした。本反応試料5μlを1% TBEアガロースゲル(0.5μg/mlのエチジウムブロマイド含有)にて電気泳動し、本ゲルを254nmの紫外線照射(フナコシ社製)によってDNAのバンドを検出し、遺伝子増幅の確認を行った。

##### 【0055】

プライマー配列は以下の通りとした。

=HOR7遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

HOR7P-U (35mer、Tm値 72.6℃、末端に制限酵素NotIサイトを付加)

5' - ATA TAT GCG GCC GCT CGC AGC CAC GG  
G TCA ACC CG -3' (配列番号: 26)

HOR7P-D (41mer、Tm値 53.7℃、末端に制限酵素SpeIサイトを付加)

5' - ATA TAT ACT AGT TTT TAT TAT TAG TC  
T TTT TTT TTT TTG AC -3' (配列番号: 27)

##### 【0056】

=TDH2遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

TDH2P-U (39mer、Tm値 67.1℃、末端に制限酵素NotIサイトを付加)

5' - ATA TAT GCG GCC GCT TGA CGG GTA TT  
C TGA GCA TCT TAC -3' (配列番号: 28)

TDH2P-D (38mer、Tm値 56.5℃、末端に制限酵素SpeIサイトを付加)

5' - TAT ATA CTA GTT TGT TTT GTT TGT TT  
G TGT GAT GAA TT -3' (配列番号: 29)

【0057】

=HXT7遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

HXT7P-U (33mer、Tm値 68.4℃、末端に制限酵素NotIサイトを付加)

5' - ATA TAT GCG GCC GCC CTG CTA AAC AC  
G CCC TAC -3' (配列番号: 30)

HXT7P-D (40mer、Tm値 52.5℃、末端に制限酵素SpeIサイトを付加)

5' - ATA TAT ACT AGT TTT TGA TTA AAA TT  
A AAA AAA CTT TTT G -3' (配列番号: 31)

【0058】

=HSP30遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

HSP30P-U (34mer、Tm値 64.5℃、末端に制限酵素NotIサイトを付加)

5' - ATA TAT GCG GCC GCT GAA TAC GTC CT  
G TCA ATT C -3' (配列番号: 32)

HSP30P-D (36mer、Tm値 54.0℃、末端に制限酵素SpeIサイトを付加)

5' - ATA TAT ACT AGT TGA AAT TTG TT  
G TTT TTA GTA ATC -3' (配列番号: 33)

【0059】

=AHP1遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

AHP1P-U (35mer、Tm値 65.5℃、末端に制限酵素NotIサイトを付加)

5' - ATA TAT GCG GCC GCA TCC GAA TTC AA  
T GTA GCA CC -3' (配列番号: 34)

AHP1P-D (37mer、Tm値 58.6℃、末端に制限酵素SpeIサイトを付加)

5' - ATA TAT ACT AGT GTT TTG TTG TGG TT  
A TTG GTA GTA C -3' (配列番号: 35)

【0060】

=MRH1遺伝子プロモーター増幅用プライマー=

MRH1P-U (47mer、Tm値 71.1℃、末端に制限酵素NotIサイトを付加)

5' - AGC TAG CTA GCG GCC GCG ATG GAA GA  
T GCA ACT TGC AAA TGT AGT CC -3' (配列番号: 36)

MRH1P-D (47mer、Tm値 64.1℃、末端に制限酵素SpeIサイトを付加)

5' - AGC TAG CTA CTA GTG TTA TTT TTC TT  
C TTT GTT CTG TGG GTT AAA GG -3' (配列番号: 37)

## 【0061】

=TDH3遺伝子プロモーター増幅用プライマー(コントロール) =  
 TDH3P-U (42mer、T<sub>m</sub>値 69.5℃、末端に制限酵素Not Iサイトを  
 付加)

5' - AGC TAG CTA GCG GCC GCG TTG AAT GT  
 T AGC GTC AAC AAC AAG -3' (配列番号: 38)

TDH3P-D (47mer、T<sub>m</sub>値 62.3℃、末端に制限酵素Spe Iサイトを  
 付加)

5' - AGC TAG CTA CTA GTT TGT TTG TTT AT  
 G TGT GTT TAT TCG AAA CTA AG -3' (配列番号: 39)

## 【0062】

=PDC1遺伝子プロモーター増幅用プライマー(コントロール) =  
 PDC1P-U (42mer、T<sub>m</sub>値 67.1℃、末端に制限酵素Not Iサイトを  
 付加)

5' - AGC TAG CTA GCG GCC GCG TTG AAT GT  
 T AGC GTC AAC AAC AAG -3' (配列番号: 40)

PDC1P-D (37mer、T<sub>m</sub>値 56.4℃、末端に制限酵素Spe Iサイトを  
 付加)

5' - TAT ATA CTA GTT TGA TTG ATT TGA CT  
 G TGT TAT TTT G -3' (配列番号: 41)

## 【0063】

取得したPCR断片を、pBluescript II SK+ベクター(東洋紡社製)  
 へサブクロニングした。一連の反応操作は、一般的なDNAサブクロニング法に準じ  
 て行った。すなわち、制限酵素Not IおよびSpe I(いずれもタカラバイオ社製)処  
 理した上記ベクターに、同様の制限酵素で処理した各プロモーター断片をT4 DNA  
 Ligaseによって連結した。T4 DNA Ligase反応には、LigA Fast  
 Rapid DNA Ligation(プロメガ社製)を用い、詳細は付属のプロ  
 トコールに従った。

## 【0064】

次に、ligation反応液を大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌を形質転換  
 した。大腸菌コンピテント細胞はJM109株(東洋紡社製)を使用し、詳細な取り扱い  
 は付属のプロトコールに従った。抗生物質アンピシリン100μg/mlを含有したLB  
 プレート下でコロニー選抜を行い、各選抜コロニーからプラスミドDNAを調整し、これ  
 に上記【0055】～【0062】記載のプライマーDNAを用いてコロニーPCRで確  
 認することにより、それぞれのプロモーター配列をサブクロニングした。なお、エタノ  
 ール沈殿処理、制限酵素処理等の一連操作の詳細なマニュアルは、Molecular  
 Cloning ~ A Laboratory Manual second edit  
 ion ~ (Maniatis et al., Cold Spring Harb  
 or Laboratory press. 1989)に従った。

## 【0065】

単離したプロモーター配列を含む各ベクターを、アルカリ抽出法によって調製し、これ  
 をGFX DNA Purification kit (Amersham Phar  
 macia Biotech社製)にてカラム精製した。次に、分光光度計Ultraspec  
 3000 (Amersham Pharmacia Biotech社製)に  
 てDNA濃度を測定し、DNA塩基配列キットBigDye Terminator C  
 ycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE A  
 pplied Biosystems社製)に従ってシーケンシング反応を行った。反  
 応試料を塩基配列解析装置ABI PRISM 310 Genetic Analyz  
 er (PE Applied Biosystem社製)にセットし、6種類のプロモ

ーターの塩基配列を決定した。なお、機器の使用方法的詳細は本装置付属のマニュアルに従った。配列解析によって決定したDNA配列を配列番号: 1~6に示す。

### 【実施例3】

#### 【0066】

(組換えベクターの構築)

新たに構築したこの染色体導入型ベクターをそれぞれ、pBTRP-HOR7P-LDHベクター、pBTRP-TDH2P-LDHベクター、pBTRP-HXT7P-LDHベクター、pBTRP-HSP30P-LDHベクター、pBTRP-AHP1P-LDHベクター、pBTRP-MRH1P-LDHベクターと名付けた。また、プロモーター比較のコントロールとして、TDH3遺伝子プロモーター、PDC1遺伝子プロモーター下でL-LDH遺伝子が発現可能なベクターについても構築し、これをpBTRP-TDH3P-LDHベクター、pBTRP-PDC1P-LDHベクターと名付けた。以下に、本実施例におけるベクター構築工程の詳細を図2及び図3に基づいて説明するが、ベクター構築の手順はこれに限定されるものではない。なお、ベクター構築における一連の反応操作は、一般的なDNAサブクローニング法に準じて行い、一連の酵素類はタカラバイオ社製のものを使用した。

#### 【0067】

(プレベクターの構築)

一般的なDNAサブクローニング法に従って、プレベクターpBTRP-LDHの構築を行った。本発明者らが既に構築したpBTRP-PDC1-LDHKCBベクター(特開2003-259878号公報に記載)を制限酵素ApaI、PstI処理して得られ断片を、同様の制限酵素で処理したpBluescriptII SK+ベクター(東洋紡社製)に導入し、pBTRP-PDC1Dベクターを構築した。続いて本ベクターにPCR増幅によって取得し、これを制限酵素SacI、NotI処理したTRX1断片(700bp)、PCR増幅によって取得し、これを制限酵素SpeI、BamHI処理したLDHKCB断片(2000bp)を順次連結し、プレベクターpBTRP-LDHを構築した。

#### 【0068】

なお、pBTRP-PDC1P-LDHKCBベクターは、以下の方法で構築したものである。すなわち、高等真核生物であるウシ由来のタンパク質であるL-乳酸脱水素酵素を、酵母サッカロマイセス・セレビシエ属において効率的に生産するために、ウシ由来L-乳酸脱水素酵素のアミノ酸配列をコードするDNAに対して、以下の項目を設計指針として天然にない新規な遺伝子配列(配列番号: 42)を設計し、長鎖DNAの合成方法として知られている藤本らの手法(藤本英也、合成遺伝子の作製法、植物細胞工学シリーズ7植物のPCR実験プロトコル、1997、秀潤社、p95-100)を用いて該DNAを合成した(合成したDNAをLDHKCB配列と称した)。全合成したLDHKCB配列を用いて、酵母染色体導入型ベクターpBTRP-PDC1-LDHKCBを構築した(図2右上参照)。なお、LDHKCB配列をEcoRIにて酵素処理し、同様に、EcoRIにて酵素処理したpCR2.1TOPOVector(Invitrogen)に常法により連結し、pBTOPO-LDHKCBベクターと称した。

#### 【0069】

1. pBTRP-PDC1-LDHKCB構築のためのPDC1P断片は、サッカロマイセス・セレビシエYPH株(Stratagene社)のゲノムDNAを鋳型として使用したPCR増幅法によって単離を行った。サッカロマイセス・セレビシエYPH株のゲノムDNAは、ゲノム調製キットであるFast DNA Kit(Bio 101社)を用い、詳細は、附属のプロトコルに従い、調製した。DNA濃度は分光光度計Ultrospec 3000(Amersham Pharmacia Biotech社)にて測定した。PCR反応には、増幅酵素として、増幅断片の正確性が高いとされるPyrobest DNA Polymerase(宝酒造)を使用した。上記手法にて調製したサッカロマイセス・セレビシエYPH株のゲノムDNA 50ng/サンプル、プライマーDNA 50pmol/サンプル、及びPyrobest DNA polymerase

lymerase 0.2 ユニット/サンプルを合計で50  $\mu$ l の反応系に調製した。反応溶液を、PCR増幅装置 Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems社) によってDNA増幅を行った。PCR増幅装置の反応条件は、96℃で2分の熱処理を行った後、96℃で30秒と、53℃で30秒と、72℃で60秒とのサイクルを25サイクル行い、その後4℃とした。PDC1プライマーの増幅断片を1%TBEアガロースゲル電気泳動にて遺伝子増幅断片の確認を行った。なお反応に使用したプライマーDNAは、合成DNA (サワデーテクノロジー社) を用い、このプライマーのDNA配列は以下の通りであった。

・PDC1P-LDH-U (31mer, T<sub>m</sub>値58.3℃) 末端に制限酵素BamHIサイトを付加: ATA TAT GGA TCCGCG TTT ATTTAC CTA TCT C (配列番号: 44)

・PDC1P-LDH-D (31mer, T<sub>m</sub>値54.4℃) 末端に制限酵素EcoRIサイトを付加: ATATAT GAA TTCTTT GAT TGATTT GAC TGT G (配列番号: 45)

#### 【0070】

2. 遺伝子断片であるPDC1遺伝子のプロモーター断片(PDC1P) 971bpと、PDC1遺伝子下流領域断片(PDC1D) 518bpは、上述のように、サッカロマイセス・セレビシエYPH株のゲノムDNAを鋳型として使用したPCR増幅法によって単離を行った。PCR増幅の手順は上記の通りであるが、PDC1遺伝子下流領域断片の増幅には、以下のプライマーを使用した。

・PDC1D-LDH-U (34mer, T<sub>m</sub>値55.3℃) 末端に制限酵素XhoIサイトを付加: ATATAT CTC GAGGCC AGC TAACTT CTT GGTC GAC (配列番号: 46)

・PDC1D-LDH-D (31mer, T<sub>m</sub>値54.4℃) 末端に制限酵素ApaIサイトを付加: ATATAT GAA TTCTTT GAT TGATTT GAC TGTG (配列番号: 47)

#### 【0071】

3. 上記反応にて取得したPDC1P及びPDC1D各遺伝子増幅断片をそれぞれ、エタノール沈殿処理によって精製した後、PDC1P増幅断片を制限酵素BamHI/EcoRI及びPDC1D増幅断片を制限酵素XhoI/ApaIにて制限酵素反応処理を行った。なお、以下に用いた酵素類はすべて宝酒造社製のものを用了。また、エタノール沈殿処理、制限酵素処理の一連操作の詳細なマニュアルはMolecular Cloning A Laboratory Manual second edition (Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989) に従った。制限酵素BamHI/EcoRI (宝酒造社) 及び脱リン酸化酵素Alkaline Phosphatase (BAP、宝酒造社) を施したpBluescript II SK+ベクター (東洋紡社) に、上記PCR法にて増幅し制限酵素処理を施したPDC1P断片をT4 DNA Ligase反応によって連結させた。T4 DNA Ligase反応には、LigaFast Rapid DNA Ligation System (プロメガ社) を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。

#### 【0072】

4. 次にLigation反応を行った溶液を用いて、コンピテント細胞への形質転換を行った。コンピテント細胞は大腸菌JM109株 (東洋紡社) を用い、詳細は付属のプロトコールに従って行った。得られた培養液は抗生物質アンピシリン100  $\mu$ g/mlを含むLBプレートにまいて一晚培養した。生育したコロニーにつき、インサート断片のプライマーDNAを用いたコロニーPCR法による確認、及びミニプレップによるプラスミドDNA調製溶液に対する制限酵素処理による確認を行い、ベクターpBPDC1Pを単離した。

#### 【0073】

5. ついで、先に構築されたpBTOPO-LDHKCBベクターを制限酵素EcoRI

処理及び末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理することで得られるLDH KCB遺伝子断片を、同じく制限酵素EcoRI処理、末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理を行ったpBPDC1Pベクター中に、上述と同様の操作でサブクロニングを行い、pBPDC1P-LDHKCBベクターを作製した。

#### 【0074】

6. 一方、既に構築されたpYLD1ベクターを制限酵素EcoRI/AatII処理及び末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理することで得られるLDH遺伝子（ビフィドバクテリウム・ロンガム由来）断片を、同じく制限酵素EcoRI処理、末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理を行ったpBPDC1Pベクター中に、上述と同様の操作でサブクロニングを行い、pBPDC1P-LDH1ベクターを作製した。なお、上記のpYLD1ベクターは大腸菌に導入され（名称：「E. coli pYLD1」）、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1）に、受託番号FERMBP-7423としてブダベスト条約に基づき国際寄託されている（原寄託日：平成11（1999）年10月26日）。

#### 【0075】

7. 続いて、このベクターをXhoI/ApaI処理し、同様に制限酵素処理を施した増幅PDC1D断片を連結させてpBPDC1P-LDHベクターを作製した。最後にpBPDC1P-LDHIIベクターをEcoRV処理したものに、pRS404ベクター（Stratagene社）をAatII/SspI処理、T4 DNA polymerase処理して得られたTrpマーカ断片を連結させて、pBTrp-PDC1-LDHベクターを構築した。

#### 【0076】

8. 次に、pBPDC1P-LDHKCBベクターをApaI/EcoRIにて制限酵素処理し、一方、pBTrp-PDC1-LDHベクターを、制限酵素ApaIおよびStuIで処理したTrpマーカを含む断片に処理し、増幅させた断片を連結させて、最終コンストラクトである染色体導入型pBTrp-PDC1-LDHKCBベクターを構築した。

#### 【0077】

（最終ベクターの構築及び確認）

プレベクターpBTRP-LDHを制限酵素NotI、SpeI処理し、これに上記実施例3において取得したプロモーター配列を同様の制限酵素にて処理後、それぞれ連結させた最終ベクターを作製した。今回作製したpBTRP-HOR7P-LDHベクター、pBTRP-TDH2P-LDHベクター、pBTRP-HXT7P-LDHベクター、pBTRP-HSP30P-LDHベクター、pBTRP-AHP1P-LDHベクター、pBTRP-MRH1P-LDHベクター、および比較コントロールとして作製したpBTRP-TDH3P-LDHベクター、pBTRP-PDC1P-LDHベクターについての詳細なマップを図4～11に示す。

#### 【0078】

なお、上記の一連のDNA連結反応は、LigaFast Rapid DNA Ligation（プロメガ社製）を用い、詳細は付属のプロトコルに従った。また、Ligation 反応溶液のコンピテント細胞への形質転換には、大腸菌JM109株（東洋紡社製）を使用した。いずれの場合も、抗生物質アンピシリン100μg/mlを含有したLBプレート下でコロニー選抜を行い、各コロニー用いたコロニーPCRを行うことで、目的のベクターであるかを確認した。なお、エタノール沈殿処理、制限酵素処理等の一連操作の詳細なマニュアルは、Molecular Cloning “A Laboratory Manual second edition” (Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989)に従った。

#### 【実施例4】

#### 【0079】



**(形質転換酵母の作製)**

宿主である酵母 IFO 2260 株 (社団法人・発酵研究所に登録されている菌株) のトリプトファン合成能を欠損した株を YPD 培養液 10 ml にて、30℃で対数増殖期 ( $OD_{600nm} = 0.8$ ) まで培養した。これに Frozen-EZ Yeast Transformation II キット (ZYMO RESEARCH 社製) を用いてコンピテントセルを作製した。キット添付のプロトコールに従い、このコンピテントセルに上述の実施例 4 にて構築した染色体導入型ベクターを制限酵素 PvuII 処理し、遺伝子導入した。なお、具体的な導入ベクターは、pBTRP-HOR7P-LDH ベクター、pBTRP-TDH2P-LDH ベクター、pBTRP-HXT7P-LDH ベクター、pBTRP-HSP30P-LDH ベクター、pBTRP-AHP1P-LDH ベクター、pBTRP-MRH1P-LDH ベクター、および比較コントロールとして作製した pBTRP-TDH3P-LDH ベクター、pBTRP-PDC1P-LDH ベクターの 8 種類である。これらの形質転換試料を洗浄後、100  $\mu$ l の滅菌水に溶解させてトリプトファン選抜培地に塗抹し、それぞれについて 30℃ 静置培養下で形質転換体の選抜を行った。

**【0080】**

得られたそれぞれのコロニーを新たなトリプトファン選抜培地で再度単離し、生育能を安定に保持している株を形質転換候補株とした。次に、これらの候補株を YPD 培養液 2 ml で一晩培養し、これにゲノム DNA 調製キット、Gen とるくん TM-酵母用 (タカラバイオ社製) を用いてゲノム DNA を調製した。調整した各ゲノム DNA を鋳型に PCR 解析を行い、導入遺伝子の有無が確認できたものを形質転換株とした。それぞれの形質転換酵母株における、染色体中の導入遺伝子の構造を図 12~19 に示す。

**【実施例 5】****【0081】**

(発酵試験による各プロモーターの検証)

作製した形質転換体における L-乳酸生産量を測定し、高発現プロモーターとして知られる TDH3 遺伝子プロモーター及び PDC1 プロモーターを用いた乳酸生産量と比較することで、取得した 6 種類のプロモーターの活性 (有機酸存在下での) を検証した。得られた 8 種類の形質転換酵母を YPD 液体培地 5 ml に植菌し、30℃、130 rpm で一晩、振盪培養を行い、 $OD_{600nm} = 1.2$  のものを初発菌体とした。このうちの 2 ml を 10% グルコース含有 YPD 培養液 20 ml、および 10% 相当のショ糖を含有したケーンジュース培養液 20 ml にそれぞれ植菌し (全量 22 ml)、中和剤として炭酸カルシウム (ナカライテスク社製) 1 g を添加したものを、30℃、4 日間で静置培養した。乳酸生産量の測定には、多機能バイオセンサ BF-4 装置 (王子計測機器社製) を用い、仕様の詳細は付属のマニュアルに従った。これらの結果を図 20 及び図 21 に示す。

**【0082】**

図 20 及び図 21 に示すように、HOR7 遺伝子プロモーター、TDH2 遺伝子プロモーター、及び HXT7 遺伝子プロモーターについては、対照とした PDC1 プロモーター及び TDH3 プロモーターと比較して同等あるいはそれ以上の発現強度を確認できた。また、HSP30 遺伝子プロモーター、AHP1 遺伝子プロモーター及び MRH1 遺伝子プロモーターについては、対照と比較して高い発現強度を確認することができなかったが、これらのプロモーターについては、乳酸生産量が少ないためにプロモーターによる発現強度が高まっていない状態にあると考えられ、培養系に対し外部添加にて乳酸等の有機酸を添加するか、あるいは構成的プロモーターにより乳酸を発現させることにより、高い発現強度を確認できるであろうと思われた。

**【配列表フリーテキスト】****【0083】**

配列番号: 10~41 合成プライマー

配列番号: 42、43 合成 DNA

配列番号: 44~47 合成プライマー

**【図面の簡単な説明】**

【0084】

【図1】定量的PCRにより測定した乳酸発酵時におけるmRNA発現量を示すグラフ図である。

【図2】染色体導入型ベクター構築工程の一部を示す図である。

【図3】染色体導入型ベクター構築工程の一部を示す図である。

【図4】pBTRP-HOR7P-LDHベクターのマップを示す図である。

【図5】pBTRP-TDH2P-LDHベクターのマップを示す図である。

【図6】pBTRP-HSP30P-LDHベクターのマップを示す図である。

【図7】pBTRP-HXT7P-LDHベクターのマップを示す図である。

【図8】pBTRP-AHP1P-LDHベクターのマップを示す図である。

【図9】pBTRP-MRH1P-LDHベクターのマップを示す図である。

【図10】pBTRP-PDC1P-LDHベクターのマップを示す図である。

【図11】pBTRP-TDH3P-LDHベクターのマップを示す図である。

【図12】pBTRP-HOR7P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

【図13】pBTRP-TDH2P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

【図14】pBTRP-HXT7P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

【図15】pBTRP-HSP30P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

【図16】pBTRP-AHP1P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

【図17】pBTRP-MRH1P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

【図18】pBTRP-PDC1P-LDHベクターによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

【図19】pBTRP-TDH3P-LDHベクターのマップによる形質転換株における染色体構造を示す図である。

【図20】各種形質転換酵母株における乳酸発酵試験の結果（YPD培養液）を示すグラフ図である。

【図21】各種形質転換酵母株における乳酸発酵試験の結果（ケーンジュース培養液）を示すグラフ図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Toyota Central R&D Labs., Inc.  
Toyota Motor Corporation

<120> Promotors effecting under exsisting organic acids

<130> PNTCA001

<160> 47

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 810

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

```

ctcgctcgca gccacgggtc aacccgattg ggatcacccc actggggccc aagcctgata      60
tccgacctcc atgaaat ttttttctt tcgattagca cgcacacaca tcacatagac      120
tgcgtcataa aaatacacta cggaaaaacc ataaagagca aagcgatacc tacttggaag      180
gaaaaggagc acgcttgtaa ggggggatggg ggctaagaag tcattcactt tcttttcct      240
tcgcggtccg gacccgggac ccctcctctc cccgcacgat ttcttccttt catatcttcc      300
ttttattcct atcccgttga agcaaccgca ctatgactaa atggtgctgg acatctccat      360
ggctgtgact tgtgtgtatc tcacagtggg aacggcaccg tggctcggaa acggttcctt      420
cgtgacaatt ctagaacagg ggctacagtc tcgataatag aataataagc gcatttttgc      480
tagcgccgcc gcggcgcccg tttcccaata gggaggcgca gtttatcggc ggagctctac      540
ttcttcctat ttgggtaagc ccctttctgt tttcggccag tggttgctgc aggctgcgcc      600
ggagaacata gtgataaggg atgtaacttt cgatgagaga attagcaagc ggaaaaaac      660
tatggctagc tgggagtgt tttcaatca tataaaaggg agaaattgtt gtcactatg      720
tgacagtttc tgggacgtct taacttttat tgcagaggac tatcaaatca tacagatatt      780
gtcaaaaaaa aaaaagacta ataataaaaa      810

```

<210> 2

<211> 869  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2  
 cttgacgggt attctgagca tcttactcag tttcaagatc ttttaatgtc caaaaacatt 60  
 tgagccgatac taaatacttc tgtgttttca ttaatttata aattgtactc ttttaagaca 120  
 tggaaagtac caacatcggg tgaacagtt tttcatttac atatggttta ttggtttttc 180  
 cagtgaatga ttatttgtcg ttaccctttc gtaaaagttc taacacgttt ttaagtattg 240  
 tttagtgtgct ctttcgacat atatgattat ccctgcgcgg ctaaagttaa agatgcaaaa 300  
 aacgtaagac aactgaagtt aatttacgtc aattaagttt tccagggtaa tgatgttttg 360  
 ggcttcact aattcaataa gtgtgtcatg aaatacgttg tgaagagcat ccagaaataa 420  
 tgaaaagaaa caacgaaact gggtcggcct gttgtttcct ttctttacca cgtgatctgc 480  
 ggcatttaca ggaagtcgct cgttttgcgc agttgttgca acgcagctac ggctaacaaa 540  
 gcctagtgga actcgactga tgtgttaggg cctaaaactg gtggtgacag ctgaagtga 600  
 ctattcaatc caatcatgtc atggctgtca caaagacctt gcggaccgca cgtacgaaca 660  
 catacgtatg ctaatatgtg ttttgatagt acccagtgat cgcagacctg caattttttt 720  
 gtaggttttg aagaatatat aaaggttgca ctcatcgaag atagtttttt tcttgtgtgt 780  
 ctattcattt tattattgtt tgtttaaatg ttaaaaaaac caagaactta gtttcaaatt 840  
 aaattcatca cacaacaaaa caaaacaaa 869

<210> 3  
 <211> 957  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3  
 gccctgctaa acacgcccta ctaaacactt caaaagcaac ttaaaatatt tttatcta 60  
 tatagctaaa acccaatgtg aaagacatat catactgtaa aagtgaacaaa gcagcaccgt 120  
 tgaacgccgc aagagtgtc ccataacgct ttactagagg gctagatttt aatggcccct 180  
 tcatggagaa gttatgagga caaatccac tacagaaagc gcaacaaatt ttttttccg 240

taacaacaaa catctcatct agtttctgcc ttaaacaag ccgcagccag agccgttttt 300  
 ccgccatatt tatccaggat tggtccatac ggctccgtca gaggctgcta cgggatgttt 360  
 tttttttacc ccgtggaaat gaggggtatg caggaatttg tgcggggtag gaaatctttt 420  
 ttttttttag gaggaacaac tgggtggaaga atgccacac ttctcagaaa tgcattgcagt 480  
 ggcagcacgc taattcgaaa aaattctcca gaaaggcaac gcaaaatttt ttttccaggg 540  
 aataaacttt ttatgacca ctacttctcg taggaacaat ttcgggcccc tgcgtgttct 600  
 tctgaggttc atcttttaca tttgcttctg ctggataatt ttcagaggca acaaggaaaa 660  
 attagatggc aaaaagtcgt ctttcaagga aaaatcccca ccattcttcg agatcccctg 720  
 taacttattg gcaactgaaa gaatgaaaag gaggaataa caaatatac tagaactgaa 780  
 aaaaaaaaag tataaataga gacgatatat gccaatatt cacaatgttc gaatctattc 840  
 ttcatgtgca gctattgtaa aataataaaa catcaagaac aaacaagctc aacttgtctt 900  
 ttctaagaac aaagaataaa cacaaaaaca aaaagttttt ttaatttta tcaaaaa 957

<210> 4  
 <211> 940  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4  
 cgctgaatac gtcctgtcaa ttcaaatata tcacgttgtg agcagcccta aagaagaaaa 60  
 cctcaacagc agtattacta ttacaatcaa acaactttag tgccgcgtga taccgggggt 120  
 tgaagtgggt gcattgagcc gtattcttct tccccgtaag aaagtttgtt atccttttta 180  
 ctgcgttgta atagcttctg aaaacctaaa aaatgaacgc tatgtagctc atatccgttt 240  
 tgcataagta agaataacta cttgtgcagg gtgccgaaag ggatggaaaa ccgctgcagc 300  
 aacccttggt acatacagtc ggatccatct gacttacttt ctttgcgtct ccctgcgcga 360  
 tttgtttggc cattttccag atcctctaga atttttcaag ggtcgagccg taggaggatt 420  
 ctctcagaag gcaaaaacgc atcgaaagcg tgctttgtaa gaatatttgg tatggctaaa 480  
 gtaagcaaag ccatatcccg atcccgatcc cgactcttat tccgatccct tccgccacat 540  
 cctgcatgtt tattcgaata ccaaattagc tcattctcgt tatttcatca tccctttctg 600

ctatggcaag gacaagtttt tttctagcat ctcatcgaaa actttcctct ccctaattgg 660  
 ccaaagtttt catattcatc atcagttaga aagtataata tcaatccctt acctcattac 720  
 aagttgtatc aactaaaaa aatcatatat aagtctgtga gagtcttcaa ttatttagcg 780  
 taacacctat tcactttcta atcttgtttc ttgtttttac attctgcaat acaacacaac 840  
 aacaaatatt aactcaatta ttattattta taattacaaa aacaaaacaa caagtttgag 900  
 actttaatat cttttgatta ctaaaaacaa caaatttcaa 940

<210> 5  
 <211> 800  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5  
 cgcatccgaa ttcaatgtag cacctgagat ctcaaatagc ttttggccaa tcctaattctt 60  
 gaaaacttca tggtttggta aaagctcggg ggtagtttct aactcttttg tataaaccac 120  
 gatctcgccc ttttggccag acatctgata tgagcgtgcg tgtgagtgac ttacacttg 180  
 tctatccacg tcctgaagtt gticgtgttc tttggatatt cgtgttcaag ctaataatga 240  
 gcctttaagg taatacaatt tataaaccac caccttggcc tcgatctatt gcgcttatgt 300  
 tgtctattag taatcaagaa aagaacccta aatcatcggc gtcccctgtg gggctctcgg 360  
 aaaaaccggt cctgacgtca ctgaaaagat ttcggcacat ggtcatggga ccagagaaaa 420  
 attaatccga catgtggaat atttccttcc gtttaaggtag tgagcgcgga ttttttctga 480  
 tttgtaatta tacgggggagc tctggccaaa aaggtcagta tttggtgatg aagttgaata 540  
 tcactttttg attttcttct gtatcattct ttttcttttt ccacaccctt tccggacggt 600  
 attcacatat tgttgagagg ttaaatgaaa aataaagggg tggaaaatta aggacgagat 660  
 gtaagggaaa agcataaacg aaacattata taaaggagca caatttcctc tcccttgcca 720  
 attgtgcata taccgtttct ttataacgaa atttcaacaa accagaacaa cacaagtact 780  
 accaataacc acaacaaaac 800

<210> 6

<211> 901  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6  
 tcgatggaag atgcaacttg caaatgtagt ccggttacca agagacccaa acctcttcca 60  
 ctttactatt tctcctttga gaaatataat agtttgcggt aataggtaat atgaaaaagg 120  
 caataaaaaa aagagatact tgtcaccatc tcgtctccct ttaccttttt tacttaatct 180  
 tcttcgtcgt catctgttcc atccctttcc tagcttagtc ttctccggct agttcttagt 240  
 gcggtaagca aaaaaatagc gttttttttc cctcaccagg actttttttg ttaaccgaaa 300  
 atcggcatct ctagttttcc tggacaaaaa agacaaaatg gaaataaaca ctcatagcaa 360  
 tcagtaaaga tgtaaataat cgcagtaacg actgcacaag gatgtcagaa aaagcagttt 420  
 aattccagaa gtggttttcc aatttatcac acatgtacat gaagggaat gtttaaatac 480  
 ggtcttcgta aaacaaagga tctcttcacc tggtttcttc atttataagt agtgtctttt 540  
 tcggtaactt aagatatatc cttatttctt tcccacttct cgttatttct tctttttccc 600  
 ttttcaagtt cttcttttta tttattatta agcttatttt aattcttaga tcgttgtcac 660  
 tatcttttgt ctttattggt aagaaacatt gcgaagaaaa agaataataa aagaaactca 720  
 gaaaaaaaag aagtttcctc gaacaaaaat attattattt caataacttt ttctttctct 780  
 acatccaatt ttttgaccct attttaacat taattttttg ctttaatttt aactaatacc 840  
 taatttcact taatatctaa tcatcttcc ttaaccaca gaacaaagaa gaaaaataac 900  
 a 901

<210> 7  
 <211> 999  
 <212> DNA  
 <213> Bovine

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(999)  
 <223> Lactate Dehydrogenase

<400> 7

atg gca act ctc aag gat cag ctg att cag aat ctt ctt aag gaa gaa 48  
 Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu Lys Glu Glu  
 1 5 10 15

cat gtc ccc cag aat aag att aca att gtt ggg gtt ggt gct gtt ggc 96  
 His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly Ala Val Gly  
 20 25 30

atg gcc tgt gcc atc agt atc tta atg aag gac ttg gca gat gaa gtt 144  
 Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala Asp Glu Val  
 35 40 45

gct ctt gtt gat gtc atg gaa gat aaa ctg aag gga gag atg atg gat 192  
 Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Glu Met Met Asp  
 50 55 60

ctc caa cat ggc agc ctt ttc ctt aga aca cca aaa att gtc tct ggc 240  
 Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly  
 65 70 75 80

aaa gac tat aat gtg aca gca aac tcc agg ctg gtt att atc aca gct 288  
 Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr Ala  
 85 90 95

ggg gca cgt cag caa gag gga gag agc cgt ctg aat ttg gtc cag cgt 336  
 Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln Arg  
 100 105 110

aac gtg aac atc ttt aaa ttc atc att cct aat att gta aaa tac agc 384  
 Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr Ser  
 115 120 125

cca aat tgc aag ttg ctt gtt gtt tcc aat cca gtc gat att ttg acc 432  
 Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr  
 130 135 140

tat gtg gct tgg aag ata agt ggc ttt ccc aaa aac cgt gtt att gga 480  
 Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly  
 145 150 155 160

agt ggt tgc aat ctg gat tca gct cgc ttc cgt tat ctc atg ggg gag 528  
 Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly Glu  
 165 170 175

agg ctg gga gtt cac cca tta agc tgc cat ggg tgg atc ctt ggg gag 576  
 Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly Glu  
 180 185 190

cat ggt gac tct agt gtg cct gta tgg agt gga gtg aat gtt gct ggt 624  
 His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala Gly



195

200

205

gtc tcc ctg aag aat tta cac cct gaa tta ggc act gat gca gat aag 672  
Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp Lys  
210 215 220

gaa cag tgg aaa gcg gtt cac aaa caa gtg gtt gac agt gct tat gag 720  
Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr Glu  
225 230 235 240

gtg atc aaa ctg aaa ggc tac aca tcc tgg gcc att gga ctg tca gtg 768  
Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser Val  
245 250 255

gcc gat ttg gca gaa agt ata atg aag aat ctt agg cgg gtg cat ccg 816  
Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro  
260 265 270

att tcc acc atg att aag ggt ctc tat gga ata aaa gag gat gtc ttc 864  
Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val Phe  
275 280 285

ctt agt gtt cct tgc atc ttg gga cag aat gga atc tca gac gtt gtg 912  
Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val Val  
290 295 300

aaa gtg act ctg act cat gaa gaa gag gcc tgt ttg aag aag agt gca 960  
Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser Ala  
305 310 315 320

gat aca ctt tgg ggg atc cag aaa gaa ctg cag ttt taa 999  
Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe  
325 330

<210> 8  
<211> 332  
<212> PRT  
<213> Bovine

<400> 8

Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu Lys Glu Glu  
1 5 10 15

His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly Ala Val Gly  
20 25 30

Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala Asp Glu Val  
35 40 45

Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Glu Met Met Asp  
50 55 60

Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly  
65 70 75 80

Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr Ala  
85 90 95

Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln Arg  
100 105 110

Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr Ser  
115 120 125

Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr  
130 135 140

Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly  
145 150 155 160

Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly Glu  
165 170 175

Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly Glu  
180 185 190

His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala Gly  
195 200 205

Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp Lys  
210 215 220

Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr Glu  
225 230 235 240

Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser Val  
                   245                  250                  255

Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro  
                   260                  265                  270

Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val Phe  
                   275                  280                  285

Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val Val  
                   290                  295                  300

Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser Ala  
                   305                  310                  315                  320

Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe  
                   325                  330

<210> 9  
 <211> 971  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 9  
 aagggtagcc tccccataac ataaactcaa taaaatatat agtcttcaac ttgaaaaagg 60  
 aacaagctca tgcaaagagg tggtagccgc acgccgaaat gcatgcaagt aacctattca 120  
 aagtaatatc tcatacatgt ttcatgaggg taacaacatg cgactgggtg agcatatgct 180  
 ccgctgatgt gatgtgcaag ataaacaagc aagacggaaa ctaacttctt cttcatgtaa 240  
 taaacacacc ccgcgtttat ttacctatct ttaaacttca acaccttata tcataactaa 300  
 tatttcttga gataagcaca ctgcacccat accttcctta aaagcgtagc ttccagtttt 360  
 tgggtggttcc ggcttccttc ccgattccgc ccgctaaacg catatTTTTg ttgcctggtg 420  
 gcatttgcaa aatgcataac ctatgcatTT aaaagattat gtatgctctt ctgacttttc 480  
 gtgtgatgaa gctcgtggaa aaaatgaata atttatgaat ttgagaacaa ttctgtgttg 540

ttacggtatt ttactatgga ataattaatc aattgaggat tttatgcaa tatcgtttga 600  
 atatcccccc gaccctttga gtacttttct tcataattgc ataatttgt ccgctgcccg 660  
 tttttctggt agacggtgtc ttgatctact tgctatcggt caacaccacc ttatcccccc 720  
 actatcccccc ttttagctca ttggaatcag cttatgggtga tggcacattt ttgcataaac 780  
 ctagctgtcc tcgttgaaca taggaaaaaa aaatatatta acaaggctct ttcactctcc 840  
 ttgcaatcag atttgggttt gtccccctta tttcatatt tcttgctata ttcctttctc 900  
 aattattatt ttctactcat aaccacacgc aaaataacac agtcaaatac atcaaagatc 960  
 ccccaattct c 971

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic primer

<400> 10  
 cgtcgccttc actggttttag 20

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthtic primer

<400> 11  
 caaaaaggcc aaagcaccag 20

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthtic primer

<400> 12

21

caaggtaagt tgaccggtat g

<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 13  
gatggaagag ttagagtcac cc

22

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthtic primer

<400> 14  
tcatgggctg tttggtcttc

20

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 15  
agcgtcgtag ttggcacctc

20

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 16  
aattgcagtc agccgtgatg

20

<210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic primer

<400> 17  
 tcgacagctt gctctgcttc 20

<210> 18  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic primer

<400> 18  
 aaccaagcgt gggctaagag 20

<210> 19  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic primer

<400> 19  
 ggtttccttg gcagcgtaag 20

<210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic primer

<400> 20  
 gctgcctgtg ttactccac 20

<210> 21

<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthtic primer

<400> 21  
tggctgcaaa acgttaccac

20

<210> 22  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 22  
caacgaattg aacgctgctt ac

22

<210> 23  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 23  
attcaacggc ttccttaact tctg

24

<210> 24  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 24  
gttttcaagg aattagacac tgc

23

<210> 25  
<211> 23  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 25

caacagtcctt ttgagtagca gtc

23

<210> 26

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 26

atatatgcgg ccgctcgcag ccacgggtca acccg

35

<210> 27

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 27

atatatacta gtttttatta ttagtcctttt tttttttga c

41

<210> 28

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic primer

<400> 28

atatatgcgg ccgcttgacg ggtattctga gcatcttac

39

<210> 29

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic primer

&lt;400&gt; 29

tatatactag ttgtttttgt ttgttttgtg gatgaatt

38

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sybthetic primer

&lt;400&gt; 30

atatatgcgg ccgccctgct aaacacgccc tac

33

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic primer

&lt;400&gt; 31

atatatacta gttttttgatt aaaattaaaa aaactttttg

40

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic primer

&lt;400&gt; 32

atatatgcgg ccgctgaata cgtcctgtca attc

34

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic primer

<400> 33  
atatatacta gttgaaattt gttgttttta gtaatc 36

<210> 34  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 34  
atatatgcgg ccgcatccga attcaatgta gcacc 35

<210> 35  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 35  
atatatacta gtgttttggt gtggttattg gtagtac 37

<210> 36  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 36  
agctagctag cggccgcgat ggaagatgca acttgcaaat gtagtcc 47

<210> 37  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 37

agctagctac tagtggttatt tttcttcttt gttctgtggg ttaaagg

47

<210> 38  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 38  
agctagctag cggccgcgtt gaatgttagc gtcaacaaca ag

42

<210> 39  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 39  
agctagctac tagtttgttt gtttatgtgt gtttattcga aactaag

47

<210> 40  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 40  
agctagctag cggccgcgtt gaatgttagc gtcaacaaca ag

42

<210> 41  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic primer

<400> 41  
tatatactag ttgattgat ttgactgtgt tatttttg

37

<210> 42  
 <211> 1052  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> synthetic DNA

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (13)..(1011)  
 <223>

<400> 42  
 acagaattca ca atg gct act ttg aaa gat caa ttg att caa aat ttg ttg 51  
                   Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu  
                   1                  5                  10

aaa gaa gaa cat gtt cca caa aat aaa att act att gtt ggt gtt ggt 99  
 Lys Glu Glu His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly  
           15                  20                  25

gct gtt ggt atg gct tgt gct att tct att ttg atg aaa gat ttg gct 147  
 Ala Val Gly Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala  
   30                  35                  40                  45

gat gaa gtt gct ttg gtt gat gtt atg gaa gat aaa ttg aaa ggt gaa 195  
 Asp Glu Val Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Glu  
                   50                  55                  60

atg atg gat ttg caa cat ggt tct ttg ttt ttg aga act cca aaa att 243  
 Met Met Asp Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile  
                   65                  70                  75

gtt tct ggt aaa gat tat aat gtt act gct aat tct aga ttg gtt att 291  
 Val Ser Gly Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile  
           80                  85                  90

att act gct ggt gct aga caa caa gaa ggt gaa tct aga ttg aat ttg 339  
 Ile Thr Ala Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu  
           95                  100                  105

gtt caa aga aat gtt aat att ttt aaa ttt att att cca aat att gtt 387  
 Val Gln Arg Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val  
   110                  115                  120                  125

aaa tat tct cca aat tgt aaa ttg ttg gtt gtt tct aat cca gtt gat 435  
 Lys Tyr Ser Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp  
                   130                  135                  140

att ttg act tat gtt gct tgg aaa att tct ggt ttt cca aaa aat aga 483  
 Ile Leu Thr Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg  
 145 150 155

gtt att ggt tct ggt tgt aat ttg gat tct gct aga ttt aga tat ttg 531  
 Val Ile Gly Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu  
 160 165 170

atg ggt gaa aga ttg ggt gtt cat cca ttg tct tgt cat ggt tgg att 579  
 Met Gly Glu Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile  
 175 180 185

ttg ggt gaa cat ggt gat tct tct gtt cca gtt tgg tct ggt gtt aat 627  
 Leu Gly Glu His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn  
 190 195 200 205

gtt gct ggt gtt tct ttg aaa aat ttg cat cca gaa ttg ggt act gat 675  
 Val Ala Gly Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp  
 210 215 220

gct gat aaa gaa caa tgg aaa gct gtt cat aaa caa gtt gtt gat tct 723  
 Ala Asp Lys Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser  
 225 230 235

gct tat gaa gtt att aaa ttg aaa ggt tat act tct tgg gct att ggt 771  
 Ala Tyr Glu Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly  
 240 245 250

ttg tct gtt gct gat ttg gct gaa tct att atg aaa aat ttg aga aga 819  
 Leu Ser Val Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg  
 255 260 265

gtt cat cca att tct act atg att aaa ggt ttg tat ggt att aaa gaa 867  
 Val His Pro Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu  
 270 275 280 285

gat gtt ttt ttg tct gtt cca tgt att ttg ggt caa aat ggt att tct 915  
 Asp Val Phe Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser  
 290 295 300

gat gtt gtt aaa gtt act ttg act cat gaa gaa gaa gct tgt ttg aaa 963  
 Asp Val Val Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys  
 305 310 315

aaa tct gct gat act ttg tgg ggt att caa aaa gaa ttg caa ttt taa 1011  
 Lys Ser Ala Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe  
 320 325 330

taactcgagc ttggttgaac acgttgccaa ggcttaagtg a 1052

<210> 43  
<211> 332  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 43

Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu Lys Glu Glu  
1 5 10 15

His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly Ala Val Gly  
20 25 30

Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala Asp Glu Val  
35 40 45

Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Glu Met Met Asp  
50 55 60

Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly  
65 70 75 80

Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr Ala  
85 90 95

Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln Arg  
100 105 110

Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr Ser  
115 120 125

Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr  
130 135 140

Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly  
145 150 155 160

Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly Glu  
165 170 175

Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly Glu  
180 185 190

His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala Gly  
195 200 205

Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp Lys  
210 215 220

Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr Glu  
225 230 235 240

Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser Val  
245 250 255

Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro  
260 265 270

Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val Phe  
275 280 285

Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val Val  
290 295 300

Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser Ala  
305 310 315 320

Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe  
325 330

<210> 44  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic primer

&lt;400&gt; 44

atatatggat ccgcgtttat ttacctatct c

31

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic primer

&lt;400&gt; 45

atatatgaat tctttgattg atttgactgt g

31

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic primer

&lt;400&gt; 46

atatatctcg aggccagcta acttcttggt cgac

34

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic primer

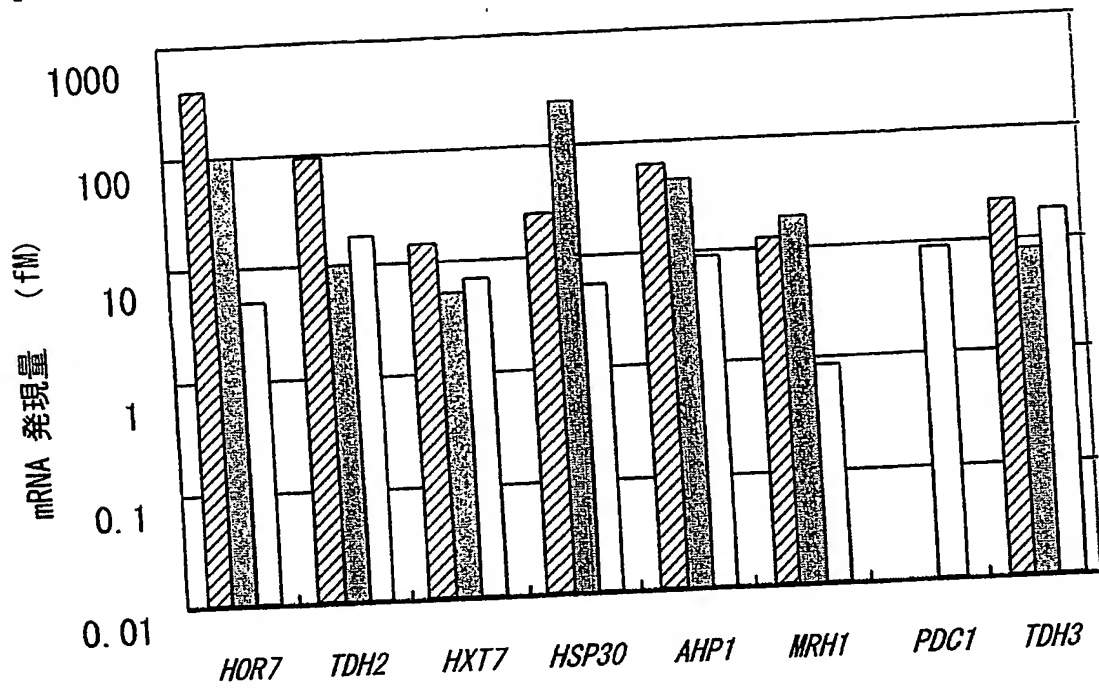
&lt;400&gt; 47

atatatgaat tctttgattg atttgactgt g

31



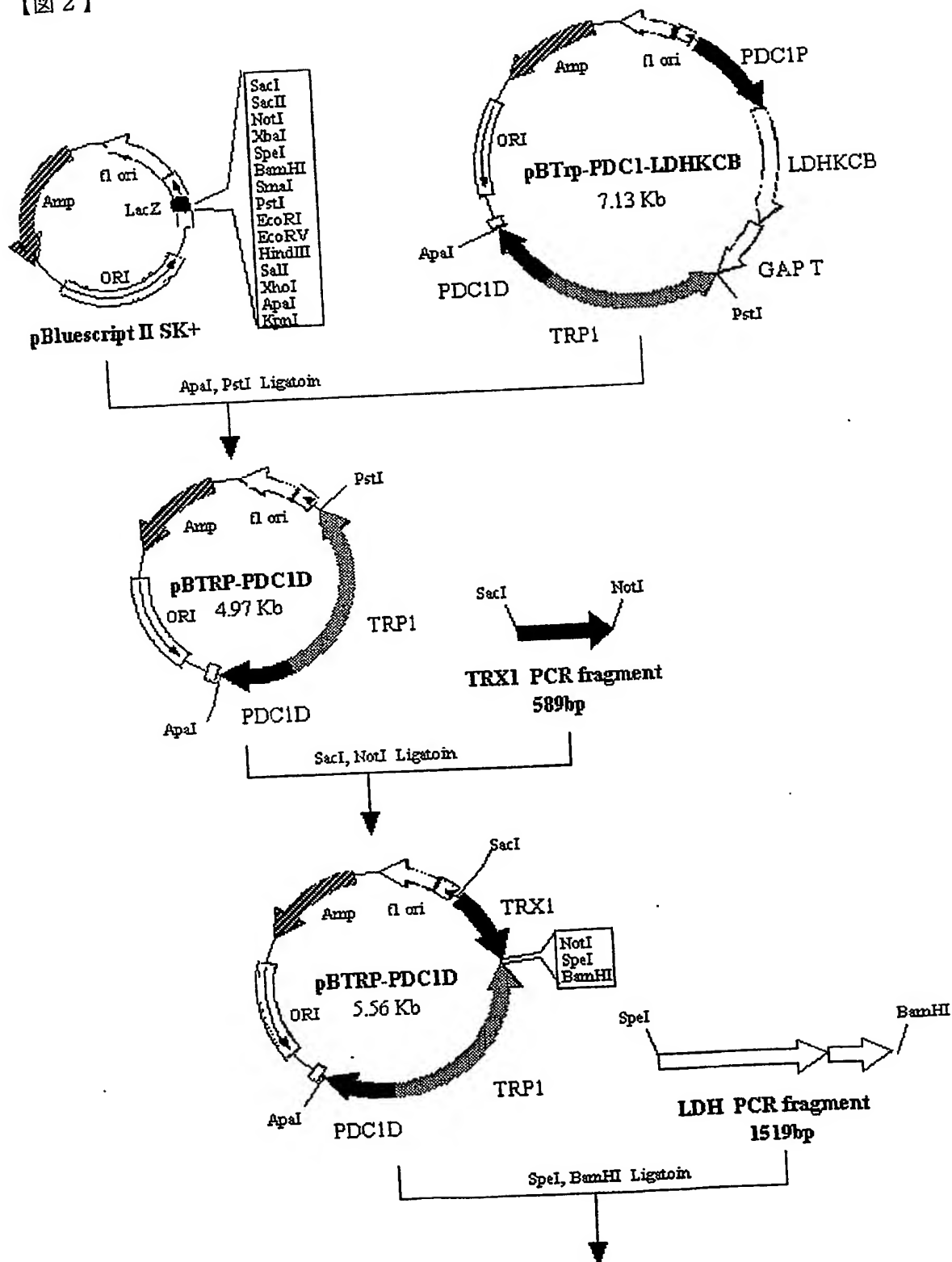
【書類名】 図面  
【図 1】



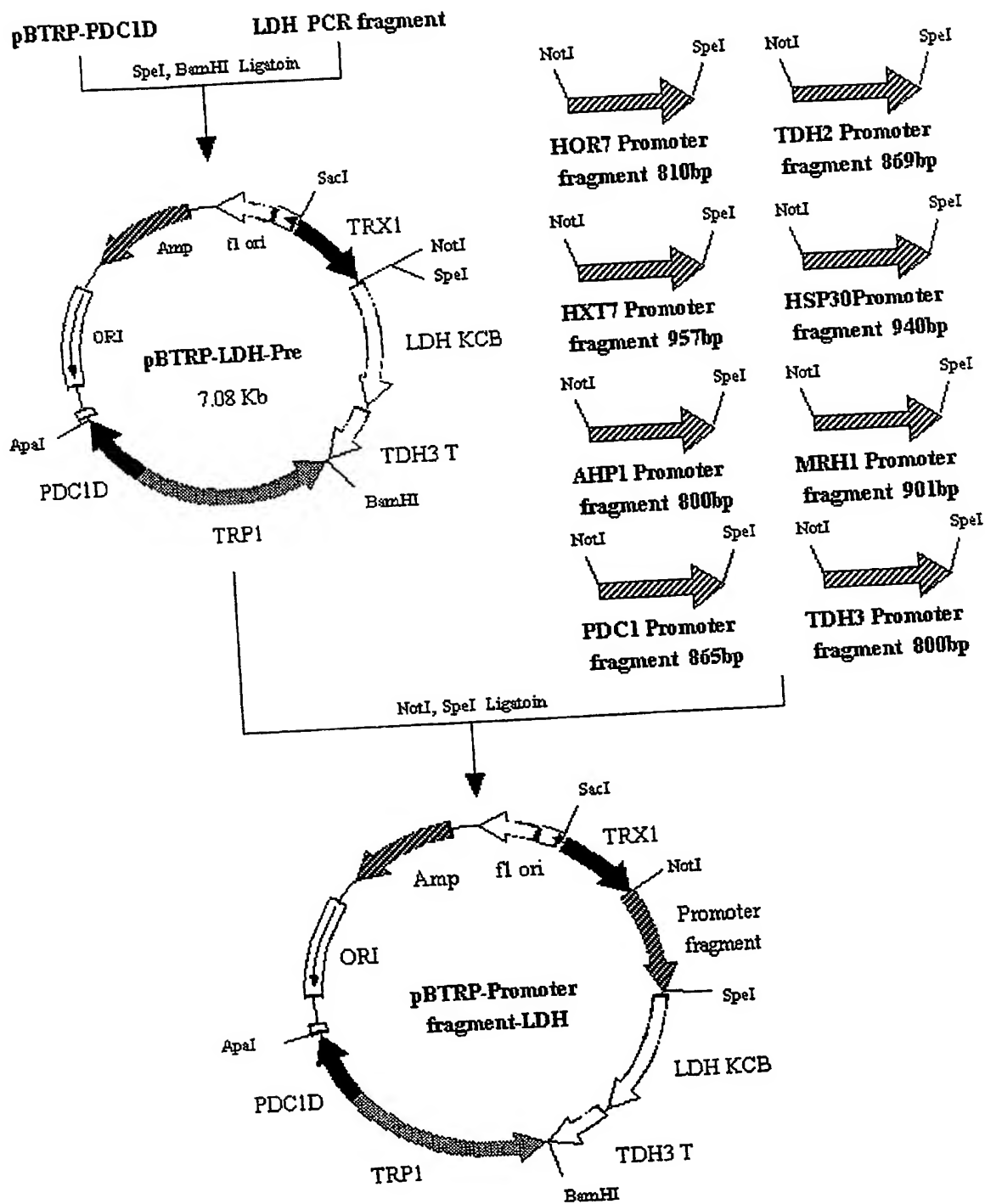
遺伝子

- |                   |           |
|-------------------|-----------|
| 遺伝子組み換え株          | 発酵開始6時間後  |
| 遺伝子組み換え株          | 発酵開始30時間後 |
| 非組み換え株 (IF02260株) | 発酵開始6時間後  |

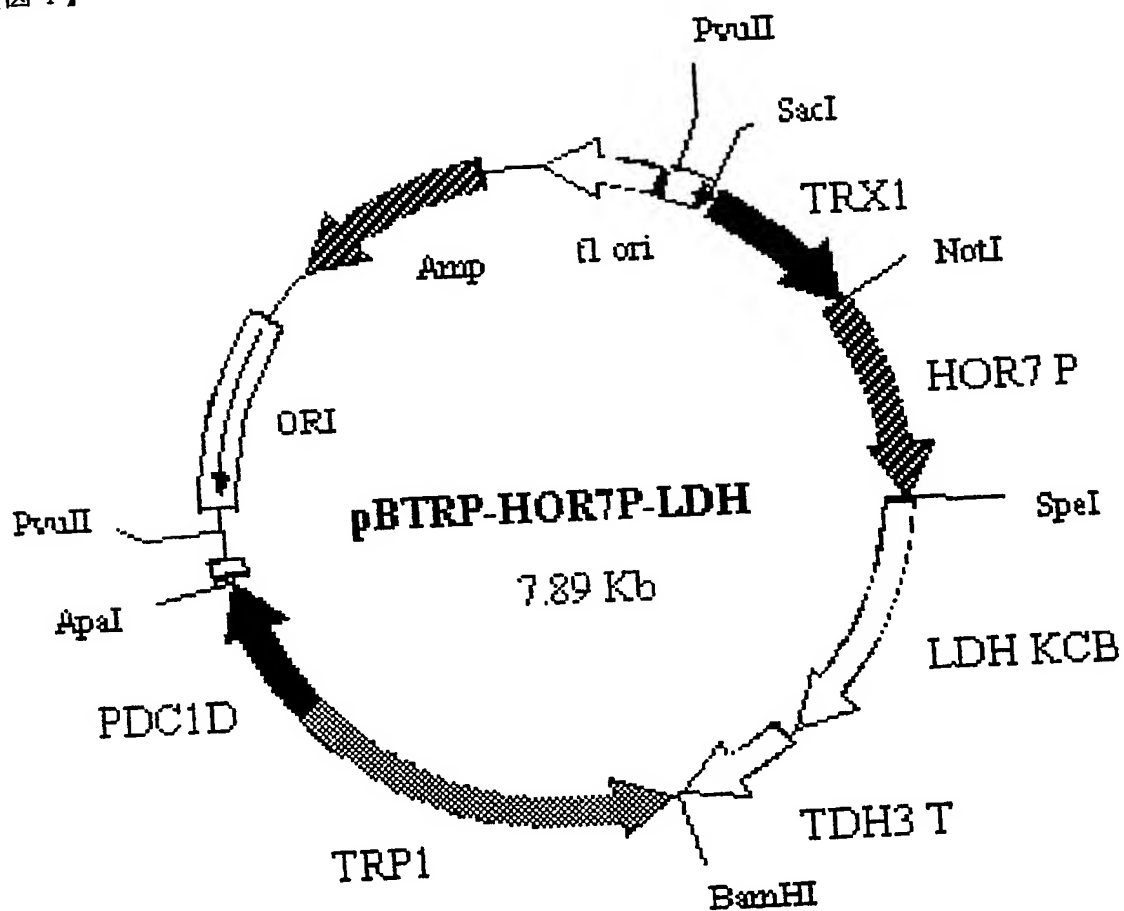
【図 2】



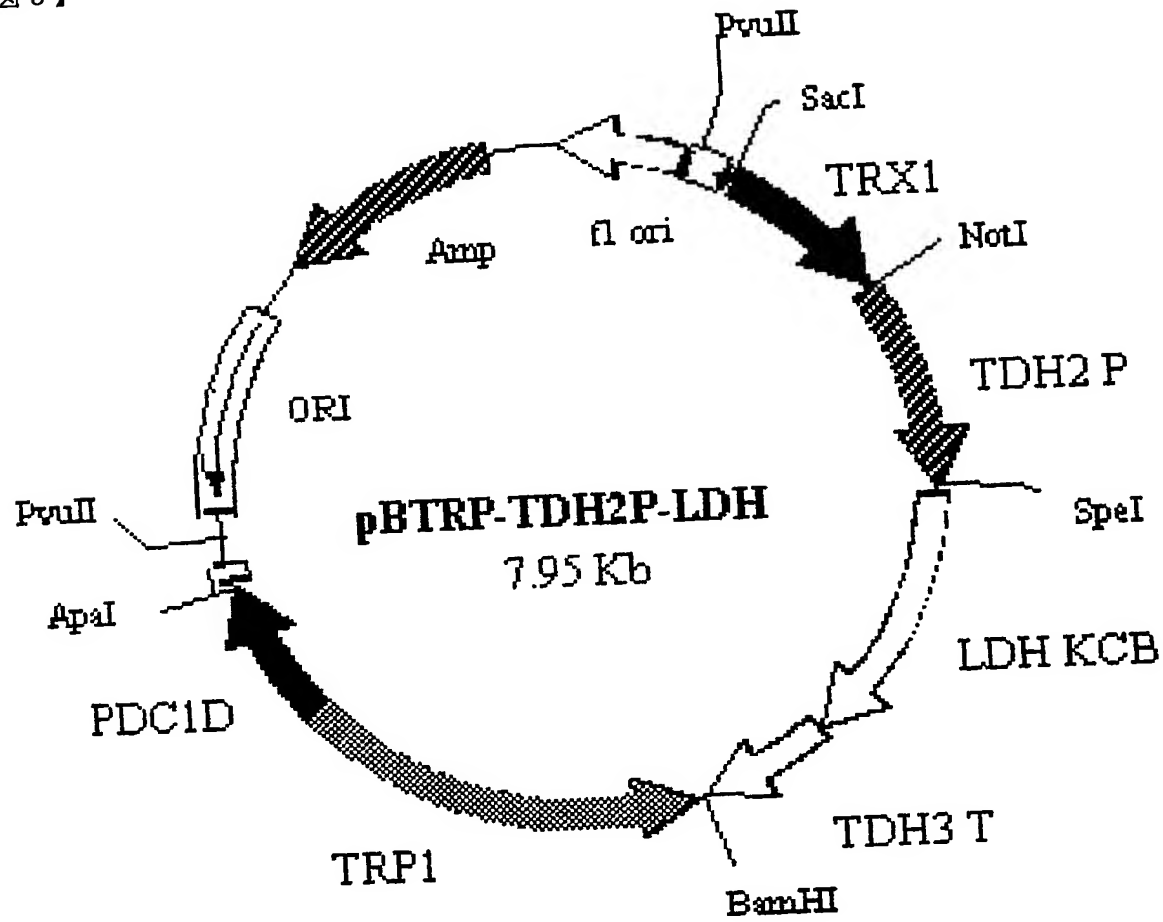
【図 3】



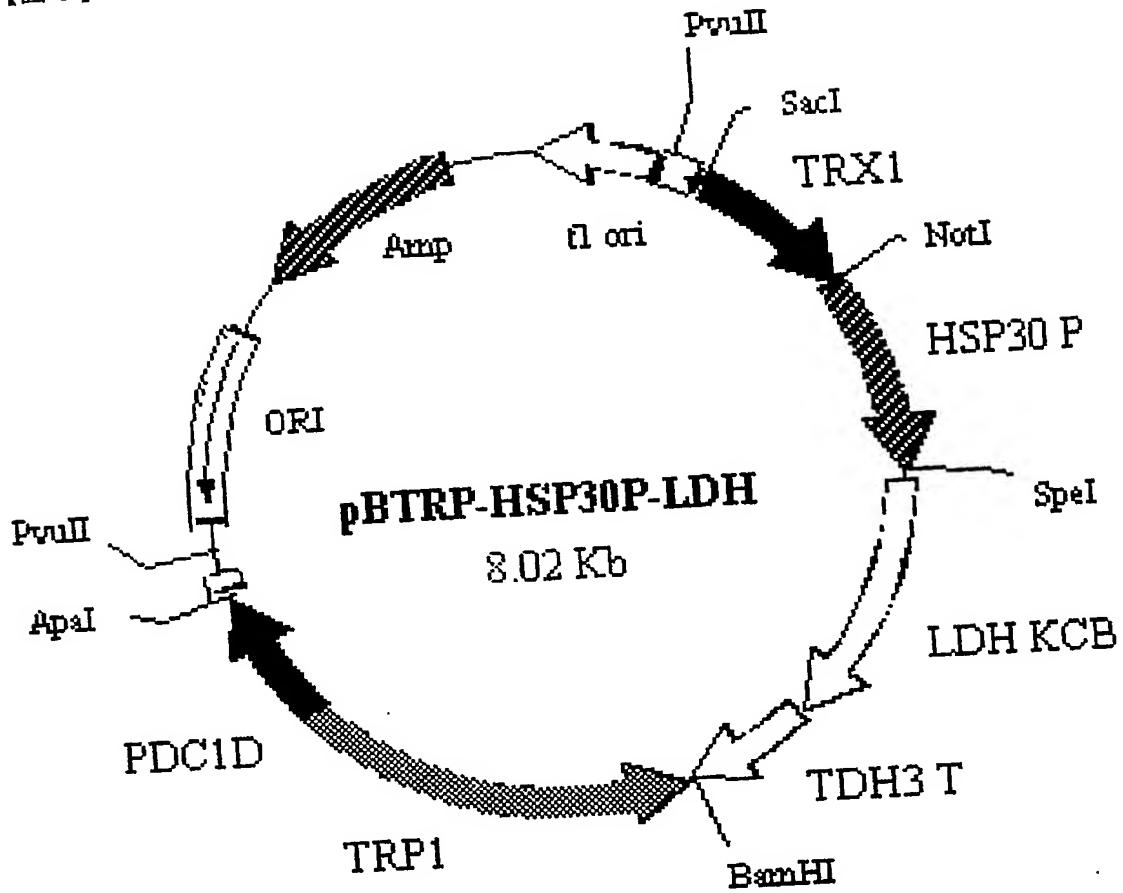
【図 4】



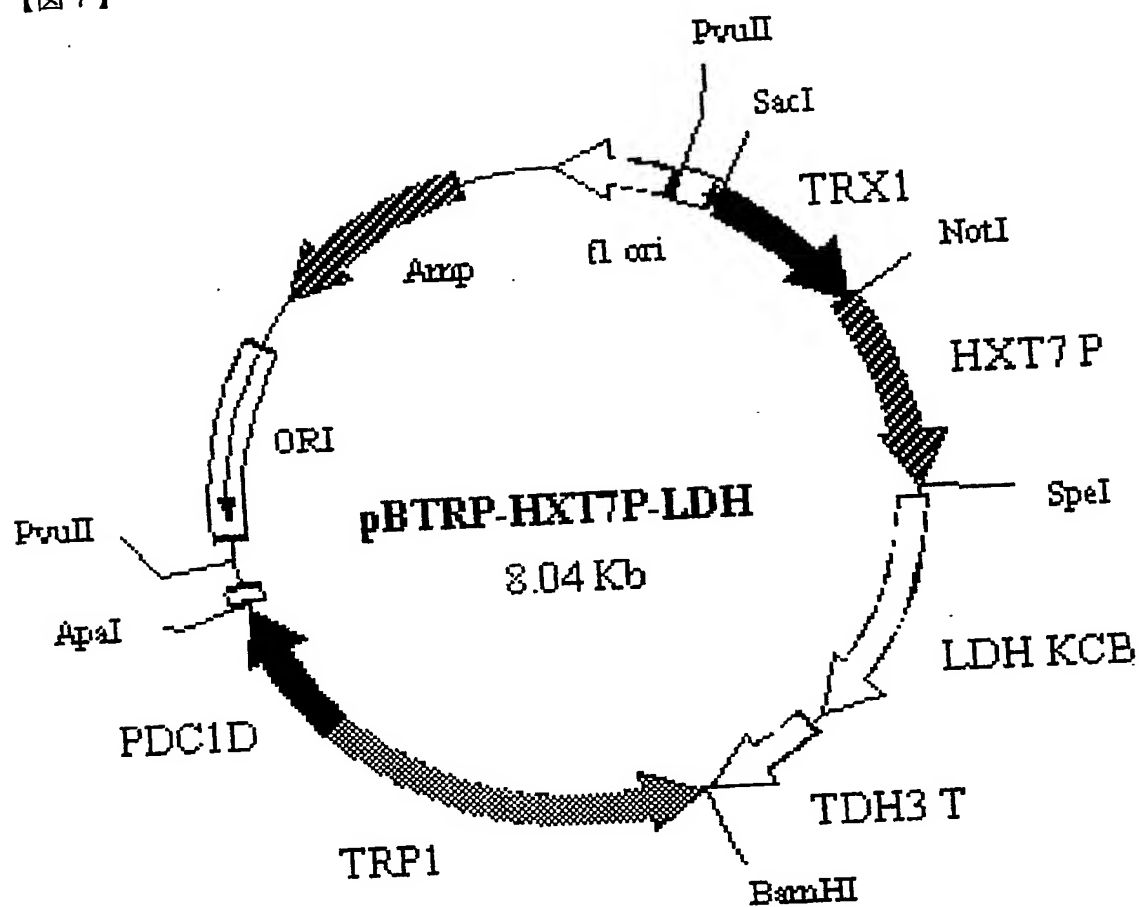
【図 5】



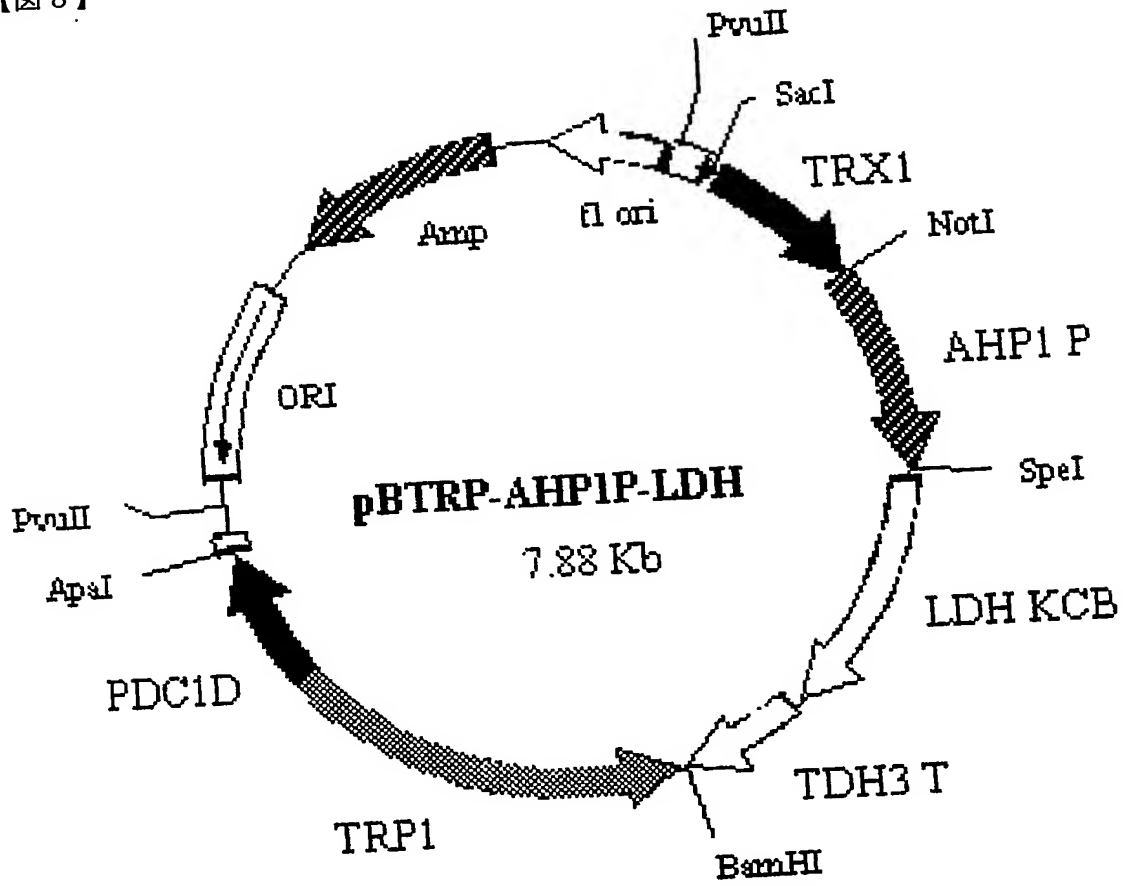
【図 6】



【図7】

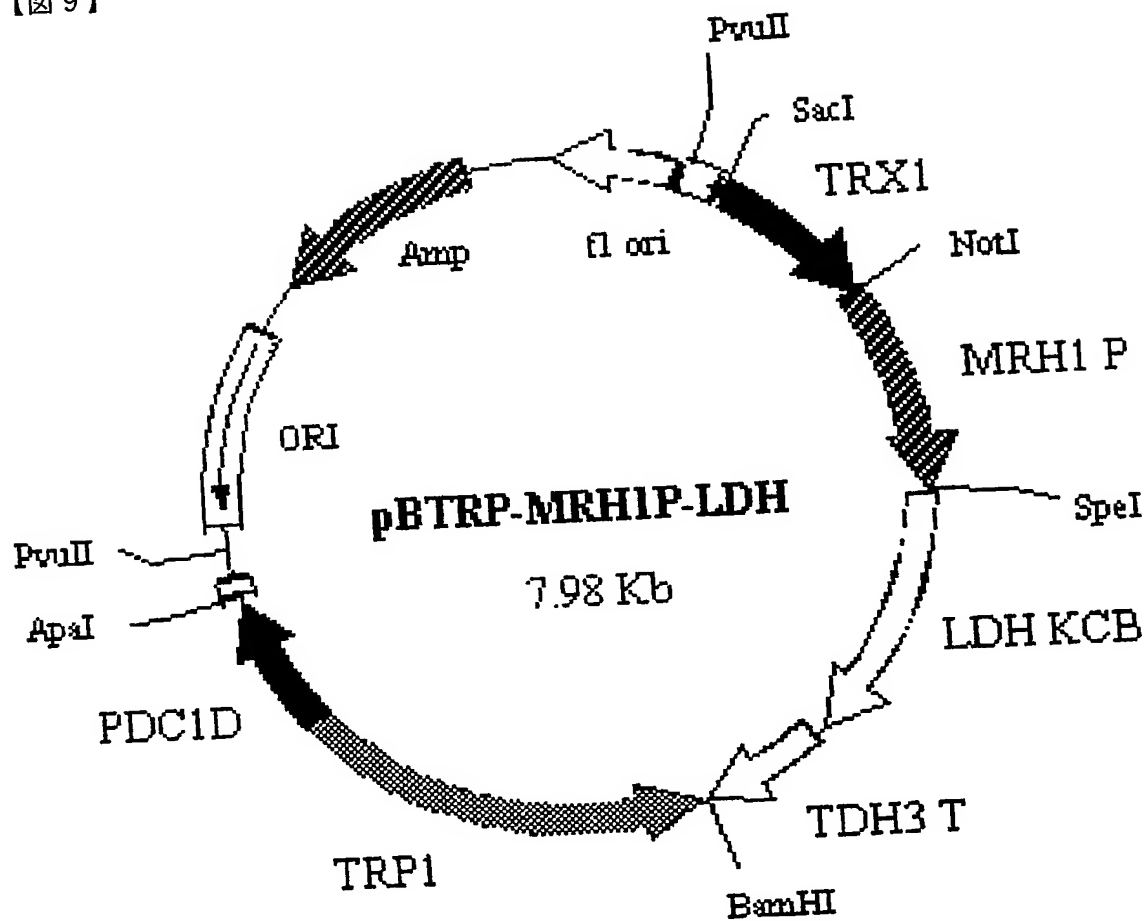


【図 8】

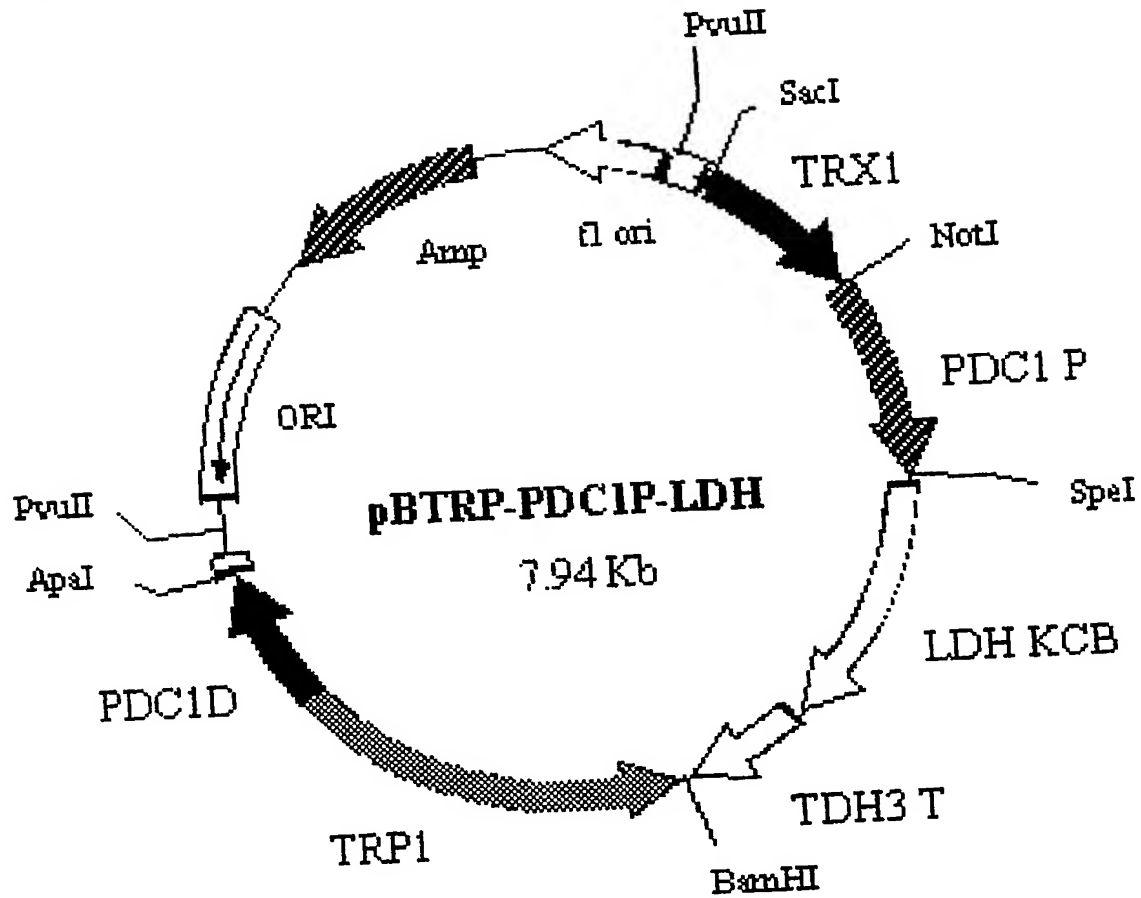




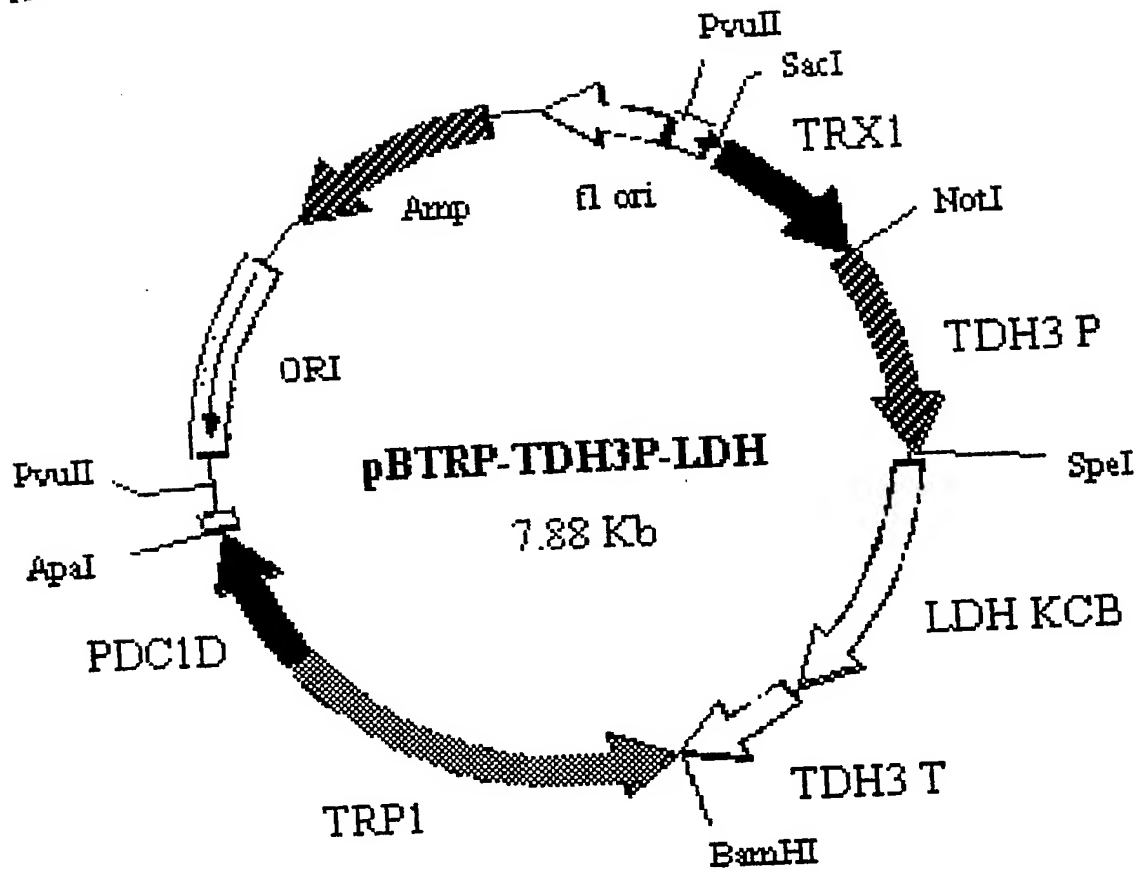
【図 9】



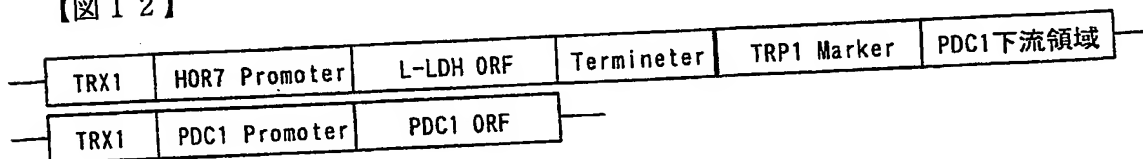
【図10】



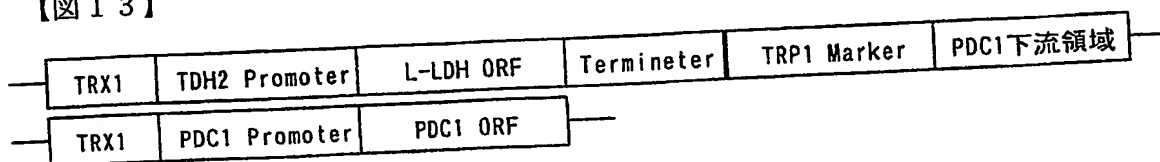
【図 1 1】



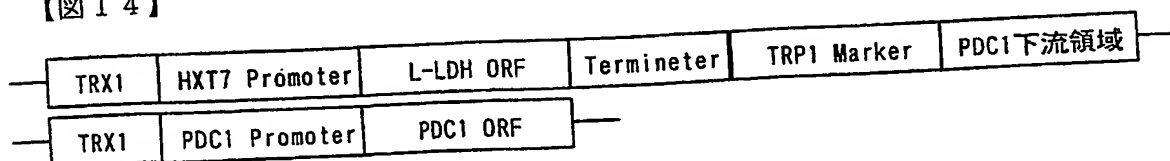
【図 1 2】



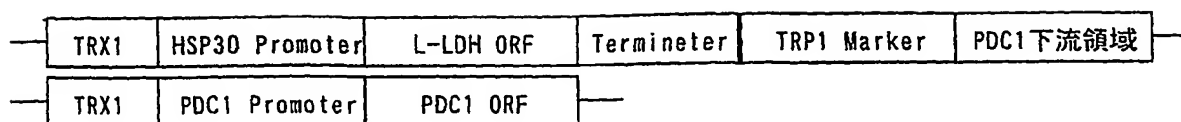
【図 1 3】



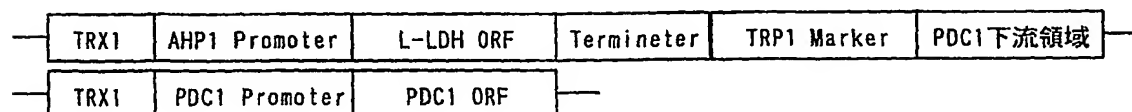
【図 1 4】



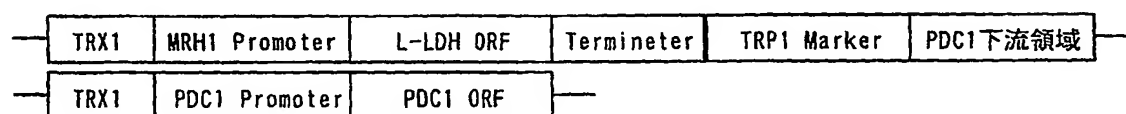
【図 15】



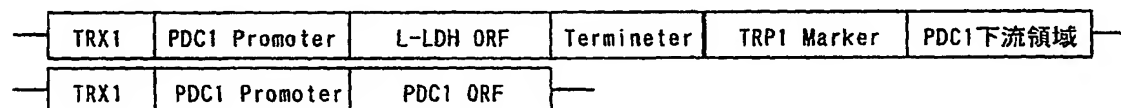
【図 16】



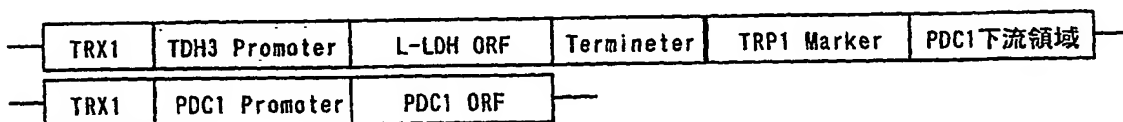
【図 17】



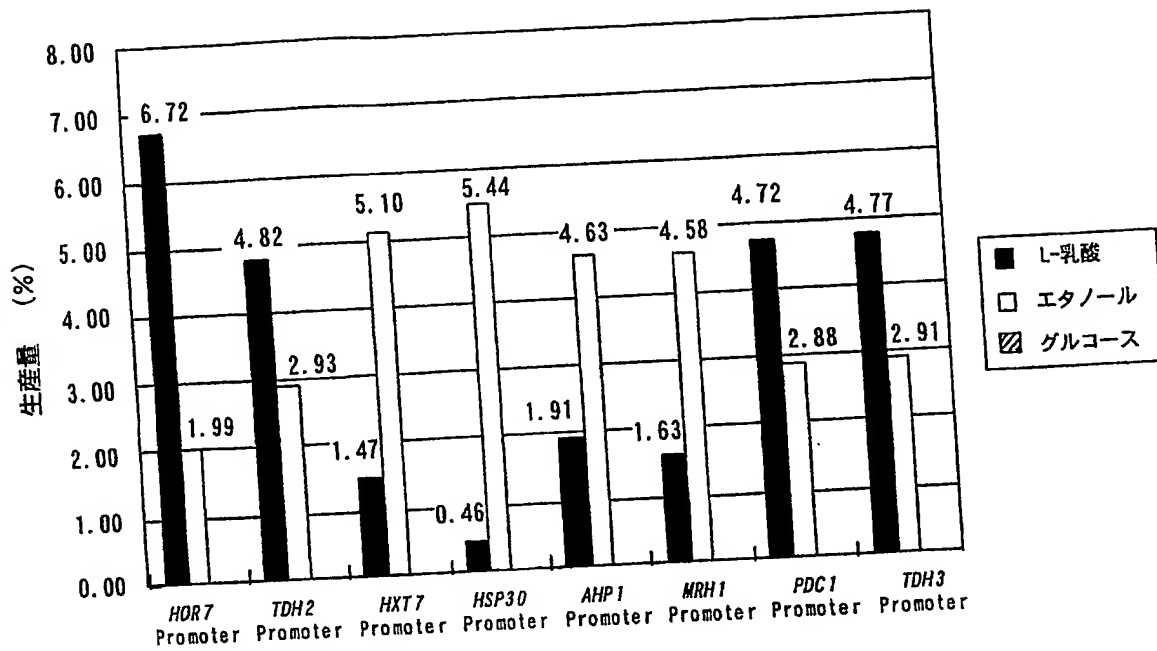
【図 18】



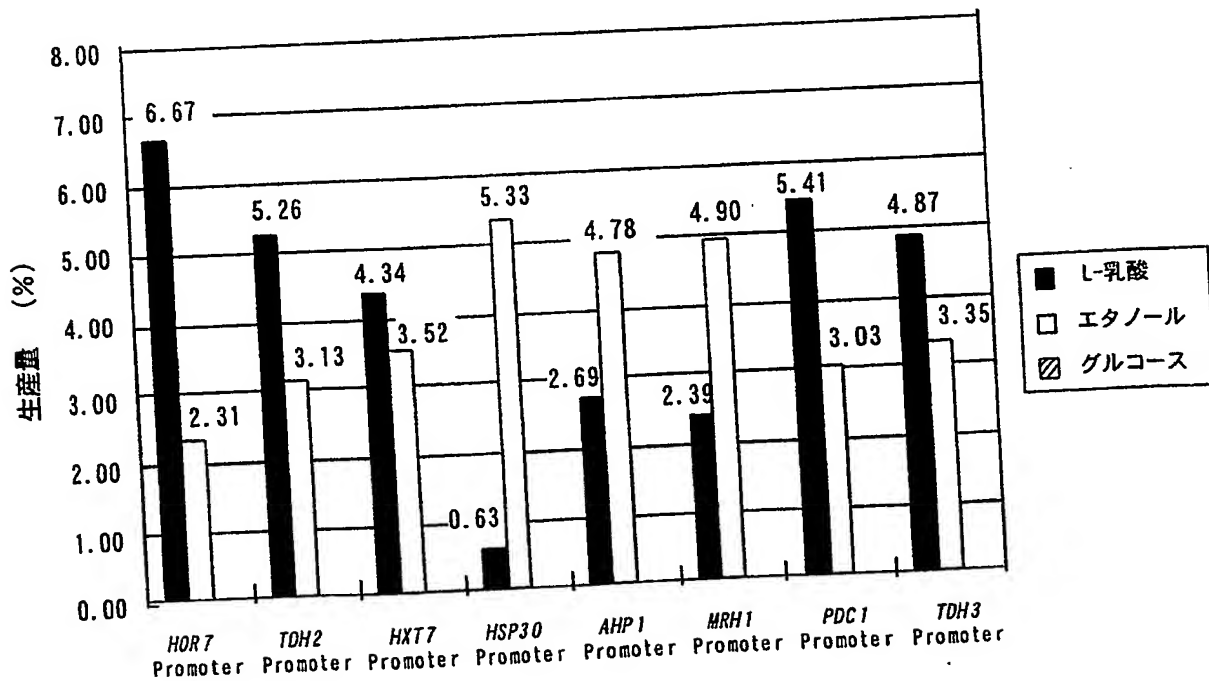
【図 19】



【図 20】



【図 21】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 有機酸存在下において利用可能なプロモーターを提供する。

【解決手段】 酵母の高浸透圧応答 7 遺伝子 (H O R 7 遺伝子)、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 2 遺伝子 (T D H 2 遺伝子)、熱ショックタンパク質 30 遺伝子 (H S P 30 遺伝子)、ヘキソース輸送タンパク質 7 遺伝子 (H X T 7 遺伝子)、チオレドキシンペルオキシダーゼ 1 遺伝子 (A H P 1 遺伝子)、及び膜タンパク質 1 関連遺伝子 (M R H 1 遺伝子) のいずれかの遺伝子のプロモーター活性を有する D N A を用いる。

【選択図】 なし

特願 2003-379076

出願人履歴情報

識別番号

[000003609]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住所  
氏名

1990年 9月 6日  
新規登録  
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1  
株式会社豊田中央研究所

特願 2003-379076

出願人履歴情報

識別番号

[000003207]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住所  
氏名

1990年 8月27日  
新規登録  
愛知県豊田市トヨタ町1番地  
トヨタ自動車株式会社



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**